



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias

**La proteína NOXY7 de *Arabidopsis thaliana*
regula la activación de la inmunidad y la
adaptación a estrés a través de una ruta
no canónica de control de síntesis de proteínas**

TESIS DOCTORAL

Yovanny Izquierdo Núñez

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias

**La proteína NOXY7 de *Arabidopsis thaliana*
regula la activación de la inmunidad y la
adaptación a estrés a través de una ruta
no canónica de control de síntesis de proteínas**

TESIS DOCTORAL

Yovanny Izquierdo Núñez

Licenciado en Bioquímica

DIRECTORA

Carmen Castresana Fernández

Centro Nacional de Biotecnología

Madrid, 2017

**La proteína NOXY7 de *Arabidopsis thaliana*
regula la activación de la inmunidad y la
adaptación a estrés a través de una ruta
no canónica de control de síntesis de proteínas**

Memoria presentada para optar al grado de
Doctor en Ciencias, por

Yovanny Izquierdo Núñez

Universidad Autónoma de Madrid,
Enero de 2017

Vº Bº de la Directora de Tesis:

Vº Bº de la Tutora de Tesis:

Dra. Carmen Castresana Fernández

Dra. Soledad Sanz Alférez

El Doctorando

Yovanny Izquierdo Núñez

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Su realización ha sido posible gracias a la financiación de la Obra Social “La Caixa” y el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

A continuación quiero además reconocer a todas las personas que han contribuido a la obtención de los resultados aquí presentados.

A la Dra. Carmen Castresana por su dirección y apoyo constante durante el tiempo de realización de esta tesis, así como por la oportunidad de trabajar su laboratorio.

A la Dra. Soledad Sanz por aceptar la tutoría de esta tesis y estar siempre disponible ante cualquier situación.

Al Profesor Mats Hamberg por facilitarnos las oxilipinas utilizadas en este trabajo.

Al Profesor Murray Grant por cedernos varias de las cepas *Pseudomonas syringae* pv. tomato utilizadas.

A la Dra. Ruth Marcos por su ayuda en el diseño y realización de varios experimentos incluidos en esta tesis, además de en la corrección del documento.

A Tomás Cascón por el aprendizaje de muchas de las técnicas utilizadas y por su colaboración en varios experimentos.

A la Dra. Mar Castellano por sus sugerencias, discusión de resultados y por cedernos las semillas de los mutantes *gcn2*.

Al Dr. Satish Kulasekaran por el trabajo previo sobre el que está basado esta tesis.

A todos los miembros del laboratorio 315 por su apoyo y colaboración.

Al Dr. José Manuel Franco y al servicio de Genómica en su conjunto por su ayuda con los análisis de expresión.

A la Dra. Gloria García por sus sugerencias en el análisis de polisomas.

A la Dra. Ma. Isabel Puga por su ayuda en el trabajo con levaduras.

A Pablo Benito y Angélica Gallego por su ayuda en el genotipado de mutantes.

Al personal del Departamento de Genética Molecular de Plantas, por su disponibilidad para la resolución de dudas, colaboración y múltiples recomendaciones en los ensayos realizados.

Al servicio de cultivo *in vitro*, por su ayuda en la preparación de medios y siembra de semillas.

Al servicio de invernadero, por su colaboración en el mantenimiento de plantas.

Al departamento de bioseguridad por su ayuda con experimentos con isótopos radioactivos.

A Inés Poveda, por el trabajo fotográfico realizado.

A los servicios de Mantenimiento e Instrumentación, por su ayuda en la resolución de los problemas técnicos surgidos.

A los departamentos de Personal y Administración, por su ayuda en numerosas ocasiones con diversos trámites.

AGRADECIMIENTOS

Nada se consigue sin ayuda, y yo la he tenido de muchas personas a las que quiero agradecer por su contribución a que este trabajo salga a la luz. Ese apoyo no siempre se traduce en bandas de western o *p-values*, pero es sin duda infinitamente más importante.

A Carmen por su apoyo siempre, su cercanía y su confianza que me han llevado a ser mucho mejor profesional.

A Tomás por su disposición infinita y su amistad, y ya que estamos, a la Juani, por tantas Carpanteadas.

A Ruth por su visión siempre ingeniosa y su enorme ayuda en lo profesional; y sobre todo por su amor y paciencia que no se pueden poner en palabras.

A los miembros del 315, pasados y presentes: Tamara, Jorge, Satish, Verónica, Marta, Ada, Rubén y Luis por su apoyo permanente.

A toda la gente del departamento GMP que me ha ayudado siempre y que me han hecho sentir como en casa con su amabilidad y disposición.

A los predocs de mi quinta (que ya muchos han dejado de serlo, se me han adelantado) por tantas quedadas, risas y cañas.

A los nuevos predocs, que también son muy majos :)

A mis amigos cubanos de este lado del charco, el Vlado, el Oreja, el Cabeza, el Norie, el Yero y Araíz, compañeros de tantos años de Universidad y luego de cubaneo por el mundo.

A mis amigos cubanos que siguen al otro lado del charco, Darién, Carlos y Alejandro, que hacen que no parezca que haya pasado el tiempo.

A mis amigos del Master que no es mi Master (Guille, Irene, Ana, Vir, Lucio, Marcos, Flori y Parras) por dejar que me acoplase sin chistar.

A Loli, Antonio, Sara y Lula, mi familia salmantina.

A Andy y Mindy que se van haciendo mayores.

A mamita, mima, papi, Lisi, Carlos, Diegui, mis tíos y primos, mi familia que hace que todo valga la pena.

A todas y todos, y a los que se me haya olvidado mencionar, gracias, muchas gracias.

Índice

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN/ABSTRACT | 1 |
| Resumen | 3 |
| Abstract | 5 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 1.1 La defensa vegetal | 9 |
| 1.1.1 Panorámica | 9 |
| 1.1.2 Tipos de respuesta de defensa según el patógeno | 10 |
| 1.1.3 Reconocimiento | 11 |
| 1.1.4 Cierre estomático | 12 |
| 1.1.5 Estallido oxidativo | 12 |
| 1.1.6 Proteínas de defensa | 13 |
| 1.1.7 Las fitohormonas en la defensa vegetal | 14 |
| 1.1.7.1 Ácido salicílico | 14 |
| 1.1.7.2 Jasmonatos | 15 |
| 1.1.7.3 Etileno | 15 |
| 1.1.7.4 Interacción entre rutas hormonales en la defensa vegetal | 16 |
| 1.2 Oxilipinas | 17 |
| 1.2.1 Síntesis | 17 |
| 1.2.2 Funciones | 18 |
| 1.2.3 Interacción con fitohormonas | 20 |
| 1.2.4 Señalización | 21 |
| 1.2.5 <i>NOXY7</i> | 22 |
| 1.2.5.1 El sistema GCN1-GCN2-GCN20 de regulación de síntesis de proteínas | 23 |
| 1.2.5.2 El complejo GCN1-GCN2-GCN20 participa en la fosforilación de eIF2 α | 23 |
| 1.2.5.3 Mecanismo de inhibición general y de activación de GCN4 | 25 |
| 1.2.5.4 La respuesta GAAC en otros organismos | 26 |
| 1.2.5.5 La respuesta GAAC en plantas | 27 |
| 2. OBJETIVOS | 33 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 37 |
| 3.1 Material Biológico | 37 |
| 3.1.1 Material Vegetal | 37 |
| 3.1.2 Especies bacterianas fitopatógenas | 37 |
| 3.2 Crecimiento de las plantas | 37 |
| 3.2.1 Crecimiento de plántulas in vitro | 37 |
| 3.2.2 Crecimiento de las plantas en tierra | 38 |
| 3.3 Crecimiento y mantenimiento de microorganismos | 38 |
| 3.4 Aislamiento de líneas homocigotas con inserciones de ADN-T | 39 |
| 3.5 Tratamiento de las plantas | 39 |
| 3.5.1 Estrés hídrico | 39 |
| 3.5.2 Infección con <i>Pseudomonas syringae</i> | 39 |

| | |
|--|----|
| 3.5.3 Evaluación de crecimiento bacteriano <i>in planta</i> | 40 |
| 3.5.4 Evaluación de la respuesta de cierre estomático | 40 |
| 3.5.5 Tratamiento de plántulas <i>in vitro</i> | 41 |
| 3.6 Tinción de calosa | 41 |
| 3.7 Evaluación de tasa de síntesis de proteínas | 41 |
| 3.8 Análisis de perfiles de ribosomas | 42 |
| 3.8.1 Fraccionamiento de polisomas en gradientes de sacarosa | 42 |
| 3.8.2 Extracción de ARN | 43 |
| 3.9 Extracción de proteínas y SDS-PAGE | 43 |
| 3.10 Western blot | 43 |
| 3.11 Extracción y análisis de ácidos nucleicos | 44 |
| 3.11.1 Extracción de ADN plasmídico | 44 |
| 3.11.2 Extracción de ADN vegetal | 44 |
| 3.11.3 Amplificación de fragmentos de ADN | 44 |
| 3.11.4 Electroforesis de ADN | 44 |
| 3.11.5 Secuenciación de ADN | 44 |
| 3.11.6 Extracción de ARN de tejido vegetal | 44 |
| 3.11.7 Electroforesis de ARN | 45 |
| 3.11.8 <i>Northern blot</i> | 45 |
| 3.11.9 Preparación de ADN complementario y PCR cuantitativa | 46 |
| 3.12 Análisis bioinformático | 46 |
| 3.12.1 Análisis de variabilidad de proteínas ribosomales | 46 |
| 3.12.2 Análisis de variabilidad de expresión de genes de proteínas ribosomales | 47 |
| 3.12.3 Correlación entre la variabilidad de secuencia y expresión dentro de las familias de proteínas ribosomales | 48 |
| 4. RESULTADOS | 51 |
| 4.1 Participación de NOXY7 en la regulación de la síntesis de proteínas | 51 |
| 4.1.1 La proteína NOXY7 participa en la fosforilación del factor de iniciación eIF2 α | 51 |
| 4.1.2 La fosforilación del factor eIF2 α no provoca una inhibición global de la síntesis de proteínas en <i>Arabidopsis</i> | 53 |
| 4.1.3 NOXY7 y GCN20 regulan la síntesis de proteínas independientemente de GCN2 y eIF2 α -P | 56 |
| 4.2 NOXY7 y GCN20 señalizan la acción de las oxilipinas independientemente de GCN2 | 57 |
| 4.3 NOXY7, pero no GCN2 ni eIF2α-P controlan la respuesta de defensa a <i>Pseudomonas</i> | 58 |
| 4.4 NOXY7 y GCN20 regulan la respuesta al ácido abscísico y estrés hídrico | 63 |
| 4.5 NOXY7 regula la síntesis de proteínas durante la respuesta de defensa | 65 |
| 4.6 La proteína NOXY7 favorece la traducción de mensajeros de defensa durante la infección | 68 |
| 4.7 Influencia de la composición ribosomal en la defensa vegetal | 72 |
| 4.7.1 Las familias de proteínas ribosomales en <i>Arabidopsis</i> son más poligénicas y diversas estructuralmente que en levaduras y mamíferos | 73 |
| 4.7.2 La proporción de proteínas ribosomales cambia durante la defensa vegetal | 76 |

| | |
|--|------------|
| 4.7.3 Las familias de proteínas ribosomales L2 y L30e modulan la respuesta de defensa | 78 |
| 5. DISCUSIÓN | 83 |
| 5.1 Papel de GCN1, GCN2 y eIF2 α -P en la regulación de la síntesis de proteínas | 84 |
| 5.2 La proteína NOXY7 actúa de forma coordinada con GCN20 durante la regulación de la traducción | 88 |
| 5.2.1 La respuesta a oxilipinas | 88 |
| 5.2.2 La respuesta al daño mitocondrial | 89 |
| 5.2.3 La susceptibilidad al ácido bórico | 90 |
| 5.2.4 La respuesta a la sequía | 92 |
| 5.2.5 La respuesta de defensa | 92 |
| 5.3 NOXY7 regula la traducción a nivel global y específico durante la respuesta de defensa | 93 |
| 5.4 La composición ribosomal en la regulación de la defensa | 96 |
| 6. CONCLUSIONES | 101 |
| MATERIAL SUPLEMENTARIO | 103 |
| BIBLIOGRAFÍA | 107 |

Resumen / Abstract

RESUMEN

Los enzimas 9-lipoxigenasas y, por tanto, los productos derivados de su actividad (oxilipinas), participan en la defensa frente a la infección de bacterias hemibiotrofas. La caracterización de mutantes de *Arabidopsis* (denominados *noxy*), afectados en la señalización de estas oxilipinas, reveló su participación en la regulación de la síntesis de proteínas. El mutante *noxy7*, localizado en el locus At1g64790 que corresponde al homólogo del regulador traduccional *GENERAL CONTROL NON-DEREPRESSIBLE1* (*GCN1*) de levaduras, ha sido caracterizado en este trabajo. Estudios en levaduras indican que la proteína *GCN1* actúa activando a la quinasa *GCN2* y la fosforilación del factor de iniciación de la traducción $eIF2\alpha$, respuesta que inhibe la síntesis de proteínas y favorece la adaptación frente a distintas situaciones de estrés. Análisis fenotípicos y de síntesis *de novo* de proteínas realizados en este estudio, nos han permitido determinar que las proteínas *NOXY7* y *GCN2* de *Arabidopsis* inducen la formación de $eIF2\alpha$ -P y favorecen la adaptación de las plantas a la carencia de aminoácidos. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre en levaduras, la formación de $eIF2\alpha$ -P en *Arabidopsis* no conlleva la inhibición global de la traducción. Además, nuestros resultados ponen de manifiesto que la proteína *NOXY7* regula la síntesis de proteínas y la adaptación de las plantas frente al daño mitocondrial, al estrés hídrico, al exceso de boro y la infección por *Pseudomonas*. En estos casos, al igual que en la señalización de las respuestas a 9KOT y 9-Oxo, la proteína *NOXY7* actúa, de forma coordinada con *GCN2*, a través de una ruta de regulación de la traducción no canónica que es independiente de *GCN2* y $eIF2\alpha$ -P. Por otro lado, la cuantificación de los transcritos presentes en el ARN total y polisómico de plantas infectadas, pone de manifiesto que la proteína *NOXY7* favorece la traducción de mensajeros de defensa durante la infección con *Pseudomonas*. Finalmente, el análisis bioinformático de las familias de proteínas ribosomales reveló una mayor variabilidad entre parálogos en *Arabidopsis* que la observada en otros organismos modelo. La variabilidad detectada está a su vez relacionada con la divergencia de los perfiles de expresión de estos genes durante la respuesta de defensa, lo que podría reflejar una estrategia evolutiva dirigida a generar ribosomas que favorecen la traducción de determinados mensajeros. Esta idea está apoyada por los niveles de resistencia frente a *Pseudomonas syringae*, evaluados en mutantes en varios de estos genes.

ABSTRACT

Oxylipins produced by 9-LOX lipoxygenases participate in the defensive response against hemibiotrophic bacteria in *Arabidopsis*. Characterization of oxylipin-insensitive mutants showed that some were affected in protein synthesis regulation. In this work we characterize one of these mutants, *noxy7*, who carries a mutation in the At1g64790 locus encoding a homolog of the yeast translational regulator GENERAL CONTROL NON-DEREPRESSIBLE-1 (GCN1). In response to nutrient deprivation, yeast GCN1 is required for the kinase activity of GCN2, which phosphorylates eIF2 α causing arrest of general protein synthesis as an adaptive response. Here, we used phenotypic and *de novo* protein synthesis analysis to demonstrate that *Arabidopsis* NOXY7 and GCN2 are also required for eIF2 α phosphorylation and plant acclimation in response to aminoacid starvation. This response, however, is not the cause of the observed protein synthesis inhibition, in clear contrast to what the yeast model predicts. A similar analysis demonstrated that NOXY7 regulates protein synthesis and adaptation in response to stresses such as mitochondrial dysfunction, drought, boron excess or *Pseudomonas* infection. NOXY7 could act in coordination with GCN20 in these processes, as well as in response to the oxylipins 9-KOT and 9-Oxo, in a non-canonical pathway independent of GCN2 and eIF2 α -P. In addition to global protein synthesis, NOXY7 controlled the preferential translation of defense-related transcripts after *Pseudomonas* infection, as inferred from quantification of messengers in total RNA and polysomic RNA fractions. Finally, a bioinformatics analysis showed that *Arabidopsis* ribosomal paralogs are more variable than their counterparts in other model systems. In *Arabidopsis*, this sequence variability was correlated to the divergence of the expression profiles of these genes during defense reactions. This suggests a plant evolutionary strategy to generate specific ribosomes after infection, which would allow a more efficient translation in these conditions. This hypothesis was supported by infection analysis on mutants in some of these ribosomal protein genes; in all cases we observed a differential response as compared to wild type plants.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos autótrofos y han desarrollado estrategias de adquisición de nutrientes específicas, en las que se prioriza la obtención de agua, elementos minerales, luz y CO₂, frente a la adquisición de sustancias orgánicas, más complejas, para su nutrición. Esta singularidad determina el tipo de metabolismo, y establece diferencias importantes en la regulación de procesos celulares esenciales, en los que las plantas difieren significativamente de los eucariontes heterótrofos, tales como las levaduras y los mamíferos.

Por otra parte, las plantas son organismos sésiles y no pueden desplazarse o alejarse de las situaciones de estrés a las que están expuestas, como por ejemplo variaciones térmicas, sequías, inundaciones, contaminantes del suelo, patógenos, plagas etc.. Esta circunstancia ha determinado, igualmente, las estrategias de adaptación desarrolladas por las plantas, y les ha permitido ser consideradas como uno de los reinos mejor adaptados de la biosfera, del que dependen, directa e indirectamente, gran parte de los organismos restantes.

1.1 La defensa vegetal

1.1.1 Panorámica

Las plantas cuentan con dos niveles de defensa frente a la infección de microorganismos patógenos: preformadas e inducidas. Las defensas preformadas son, fundamentalmente, barreras físicas y químicas preexistentes, que evitan el acceso de los patógenos al interior de la planta entre, las que cabe destacar la cutícula de la epidermis, las paredes celulares secundarias y la presencia de sustancias tóxicas conocidas como fitoanticipinas. Por el contrario, las defensas inducidas, son las que se activan en la planta cuando el patógeno ha logrado entrar al interior de la planta a través de aberturas naturales, heridas o mecanismos activos de penetración (Pieterse et al. 2009).

Las plantas no poseen células especializadas en la producción de compuestos de defensa y encargadas, por tanto, de la eliminación de los patógenos, sino que, en principio, cada célula posee la capacidad de inducir repuestas de defensa encaminadas a limitar la infección (Nu et al. 2004). Estas defensas son de índole diversa e incluyen a metabolitos antimicrobianos (antocianinas, flavonoides, isopropanoides, etc) especies reactivas de oxígeno (ROS), enzimas de degradación de estructuras microbianas, proteínas con capacidad para modificar y reforzar la pared celular y limitar el acceso de nutrientes a los patógenos, etc. El éxito o no de estas estrategias de defensa desembocará en la contención y eliminación del patógeno (interacción

incompatible) o, por el contrario, en su crecimiento y en el avance de la enfermedad y la infección de los tejidos de la planta (reacción compatible).

1.1.2 Tipos de respuesta de defensa según el patógeno

El estilo de vida de los patógenos es determinante, tanto para la infección, como para el tipo de respuesta de defensa que se activa en la planta. En este sentido, los patógenos se clasifican en biotrofos, (cuando requieren tejido vegetal vivo para la obtención de los nutrientes que les permite proliferar), necrotrofos (cuando se alimentan de tejido necrosado o muerto) o hemibiotrofos (cuando comienzan su ciclo infectivo como biotrofos y completan la infección desarrollándose como organismos necrotrofos).

Dentro de los patógenos biotrofos se encuentran hongos de gran importancia agraria como *Puccinia* spp., *Blumeria graminis* o *Ustilago maydis* (Oerke & Dehne 2004; Dean et al. 2012). En consecuencia con su forma de infección, las plantas activan una respuesta defensiva denominada respuesta hipersensible (HR, del inglés *hypersensitive response*), en la que las células vegetales indican un proceso de muerte celular programada alrededor de las zonas de infección, que impide el acceso del patógeno al tejido vivo necesario y limita su desarrollo. Durante esta respuesta, y a partir del tejido infectado, se generan señales móviles que “informan” al resto de la planta de la presencia de una infección y las “presensibilizan” frente a infecciones secundarias en las que las plantas responden de forma más rápida y eficaz para evitar la infección. A este fenómeno se le denomina resistencia adquirida o SAR (del inglés *systemic acquired resistance*) y la naturaleza de la señal móvil implicada en este proceso es por el momento fruto de controversia (Fu & Dong 2013).

A diferencia de los patógenos biotrofos, los microorganismos necrotrofos (como *Botrytis cinerea*) producen toxinas y enzimas que degradan e inducen la muerte del tejido infectado, a partir del que se alimentan. De esta manera, la estrategia defensiva de las plantas frente a patógenos necrotrofos no conlleva la activación de la HR, sino que se basa fundamentalmente en la producción de compuestos antimicrobianos. No obstante, y de manera análoga a la respuesta SAR, existe una forma de resistencia sistémica frente a patógenos necrotrofos denominada ISR (del inglés *induced systemic resistance*) que se activa a través de las rutas de señalización reguladas por la acción de las hormonas de defensa, ácido Jasmónico (JA) y etileno (ET) y que se induce en respuesta a heridas o rizobacterias no patógenas de plantas (Loon et al. 1998) (Loon 2007) (Bakker et al. 2007). Los organismos hemibiotrofos comienzan su ciclo infectivo alimentándose de tejido vivo, por lo que la forma de resistencia más efectiva para controlar su infección es la activación de la reacción hipersensible o HR. Algunos de los

patógenos pertenecientes a esta categoría producen daños muy severos en las cosechas como por ejemplo, el hongo *Magnaporthe oryzae* cuya infección provoca pérdidas anuales del 10-30% en la producción mundial de arroz (Oerke & Dehne 2004; Strange & Scott 2005).

La importancia agronómica de los patógenos biotrofos y hemibiotrofos, así como la similitud de las respuestas de defensa que se activan en la planta frente a su infección ha impulsado su estudio en la últimas décadas, utilizándose de hecho como sistemas modelo de experimentación (Dean et al. 2012). En este sentido, cabe resaltar que el estudio de la interacción entre la especie modelo *Arabidopsis thaliana* y la bacteria hemibiotrofa *Pseudomonas syringae* pav. *tomato*, ha ampliado extraordinariamente nuestro conocimiento acerca de las estrategias de defensa de la planta de defensa, que permitirán desarrollar nuevas aproximaciones de control para la protección de cosechas de importancia agronómica (Xin & He 2013).

1.1.3 Reconocimiento

La primera fase en la interacción planta-patógeno es el reconocimiento mutuo de ambos organismos. En este aspecto, las plantas han desarrollado dos niveles de percepción que actúan de forma secuencial durante la infección. El primero de ellos se establece a través de receptores transmembrana (PRR, del inglés *pattern recognition receptors*) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*) (Zipfel & Felix 2005). Los PAMPs (también denominados MAMPs, del inglés *microbe associated molecular patterns*) corresponden a moléculas de lenta evolución conservadas en distintos microorganismos en los que realizan funciones esenciales para el patógeno (Nu et al. 2004; Zipfel 2008). Los PRR suelen ser proteínas del tipo RLK-LRR (del inglés *leucine-rich repeat receptor-like kinase*) donde el dominio LRR extracelular ejecuta el reconocimiento y el dominio quinasa intracelular transduce la información al interior de la célula. El arquetipo de los PRR caracterizados es el receptor de flagelina, FLS2 (Chinchilla et al. 2007). El reconocimiento de PAMPs por parte de los PRR, desencadena cascadas de señalización en la planta dirigidas a limitar la entrada y proliferación del patógeno, denominadas en su conjunto PTI (del inglés *PAMP-triggered immunity*) (Nurnberger & Lipka 2005; Ham et al. 2007).

El segundo nivel de reconocimiento ocurre principalmente en el interior de la célula y se establece por la acción de las proteínas NB-LRR (del inglés *nucleotide bound LRR*) también conocidas como proteínas de resistencia o proteínas R (Dangl & Jones 2001). Las proteínas R participan en el reconocimiento de las proteínas secretadas por los patógenos para facilitar la

infección (denominadas efectores o factores de avirulencia; *avr*) o, con mayor frecuencia, de proteínas de la planta sobre las que actúan, en primer lugar, los efectores patogénicos. De esta manera, las proteínas R “monitorizan” en tiempo real la integridad de determinados circuitos celulares (denominados “guardianes”) (Dodds & Rathjen 2010) y son capaces de percibir cuándo están siendo modificados por algún patógeno. Esta estrategia (“hipótesis del guardián”) permite, además, ampliar indirectamente el número de efectores *avr* reconocibles. La transducción del reconocimiento que se establece a través de las proteínas R es compleja y está poco caracterizada, debido fundamentalmente a la gran variabilidad de proteínas NB-LRR identificadas. En general puede decirse que el motivo LRR funciona como “determinante antigénico”, induciendo la homopolimerización y la interacción de estos receptores con elementos aguas abajo en la señalización, mientras que el dominio NB participaría en la hidrólisis de ATP que aportará la energía necesaria para la señalización (Burch-smith et al. 2007; Wirthmueller et al. 2007; Bernoux et al. 2008). De manera análoga al reconocimiento de PAMPs por los PRRs, el reconocimiento de efectores por las proteínas R desemboca en una respuesta similar a la PTI pero de mayor amplitud e intensidad, denominada ETI (del inglés *effector-triggered immunity*) que con frecuencia conduce a la activación de las HR y la contención del patógeno (Chisholm et al. 2006; Jones & Dangl 2006).

1.1.4 Cierre estomático

Una de las primeras respuestas producidas a partir del reconocimiento de PAMPs en la superficie de la planta es el cierre estomático. Los estomas son aperturas naturales de las plantas a través de las que se realiza el intercambio de gases, y son utilizadas por los patógenos como punto de entrada en la planta. En *Arabidopsis*, el receptor FLS2, interviene en el reconocimiento de la proteína flagelina que compone los flagelos de la bacteria *P. syringae* y su interacción provoca el cierre de los estomas para impedir la entrada de la bacteria a los espacios intercelulares del mesófilo (Melotto et al. 2006; Chinchilla et al. 2006). En esta respuesta el receptor FLS2 provoca la activación de la quinasa BAK1, que genera, a su vez, una cascada de señalización mediada por MAP quinasas, Ca^{2+} y especies reactivas de oxígeno (H_2O_2 y NO) y que desemboca en la activación de canales SLAC (del inglés *slow anion channel*), que bombean aniones hacia el exterior celular causando la pérdida de agua y el cierre del estoma (Melotto et al. 2006; Chinchilla et al. 2007; Guzel Deger et al. 2015; Chatter & Gray 2015).

1.1.5 Estallido oxidativo

La inducción de las respuestas PTI y ETI activan procesos comunes dirigidos a limitar el crecimiento de los patógenos. Uno de estos procesos es el llamado “estallido oxidativo”,

caracterizado por la proliferación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) (respectivamente, del inglés *reactive oxygen species* y *reactive nitrogen species*). Estos compuestos tienen actividad antimicrobiana directa (Shetty et al. 2008; Fang & Hazlitt 2004) y a la vez inducen procesos defensivos tales como la formación de lignina y calosa (Brien et al. 2012), y la activación de la respuesta sistémica (Dubiella et al. 2013; Miller et al. 2009). La alteración del balance redox de la célula que provoca el estallido oxidativo induce, además, la expresión de genes de defensa y participa en la ejecución del programa de muerte celular que acompaña a la activación de la HR (Asai et al. 2008; Yun et al. 2011).

1.1.6 Proteínas de defensa

Además de las estrategias descritas, las plantas producen diversas clases de proteínas y metabolitos con actividad antimicrobiana en respuesta a la infección. En primer lugar, las proteínas PR (del inglés *pathogenesis-related*), clasificación oficiosa que engloba a familias de proteínas no relacionadas estructuralmente, pero que tienen en común una expresión basal muy baja que aumenta dramáticamente en respuesta a la infección de patógenos. Estas proteínas son típicamente de bajo peso molecular, resistentes a la proteólisis y secretadas al apoplasto para ejercer su acción antimicrobiana (Sels et al. 2008).

Entre estas, se encuentran proteínas con diversas actividades. Por ejemplo, quitinasas (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11) y β -1,3-glucanasas (PR-2) que degradan directamente la pared celular de los hongos; osmotinas (PR-5) que podrían crear poros en las membranas de distintos patógenos; otras proteínas que aumentan la permeabilidad de las membranas como las defensinas (PR-12), tioninas (PR-13) y proteínas de transferencia de lípidos (PR-14); ribonucleasas que podrían degradar ARN viral (PR-10); proteasas que actuarían sobre proteínas de membrana del invasor (PR-7); así como otras PR cuyo mecanismo de actividad antimicrobiana se desconoce (PR-1, PR-17) (Ferreira et al. 2007).

Otras proteínas relacionadas con la defensa de la planta poseen actividad antimicrobiana directa y además, participan en la señalización de la defensa. Por ejemplo, las oxalato oxidasas y proteínas similares a estas (PR-15 y PR-16, además conocidas como *germin-like proteins*) que generan H_2O_2 , con actividad antimicrobiana y de señalización (Bernier & Berna 2001); mientras que los ROS generados por la actividad peroxidasa de las PR-9 pueden tener actividad antimicrobiana a la vez que catalizan la síntesis de lignina contribuyendo al reforzamiento de la pared celular (Passardi et al. 2004).

Adicionalmente, algunas proteínas PR actúan interfiriendo la acción de los efectores producidos por los patógenos. Tal es el caso de la familia PR-6, que incluye inhibidores de las proteinasas producidas por diversos patógenos y plagas (Dunaevskii et al. 2005; Gutierrez-campos et al. 1999; Vila et al. 2005).

1.1.7 Las fitohormonas en la defensa vegetal

Como se ha descrito anteriormente, la activación de la respuesta de defensa vegetal conlleva la inducción coordinada de numerosos procesos como el estallido oxidativo, el reforzamiento de la pared celular, la secreción de proteínas de defensa, la activación de una reacción de muerte celular, etc. La coordinación de todos estos procesos está regulada por la acción de un conjunto de moléculas señalizadoras, entre las que destacan las hormonas vegetales: ácido salicílico (SA), jasmonatos (JA) y etileno (ET), que controlan la respuesta de defensa mediante la regulación de los genes requeridos frente a cada tipo de patógeno.

De manera simplificada puede decirse que el SA controla preferentemente la respuesta de defensa frente a la infección de patógenos biotrofos y hemibiotrofos, mientras que el JA y el ET regulan rutas de señalización convergentes, que proporcionan resistencia a patógenos necrotrofos.

1.1.7.1 Ácido salicílico

El SA puede sintetizarse por dos rutas, una citoplásmica mediada por la acción del enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), y una segunda que inicia en el cloroplasto a partir del ácido siquímico y del enzima isocorismato sintasa (ICS1). Esta última ruta es, no obstante, la que contribuye a la síntesis de la mayor parte del SA producido durante la infección de patógenos (Wildermuth et al. 2001).

La actividad principal del SA se debe a su acción sobre el activador transcripcional NPR1 que en su estado basal se encuentra en forma de oligómero en el citosol, mientras que en presencia de SA se despolimeriza generando la forma monomérica activa que entra al núcleo para actuar como activador transcripcional (Mou et al. 2003; Rochon et al. 2006). En este escenario, NPR1 interactúa con los factores de transcripción TGA activando la expresión de los genes de defensa dependientes del SA (Zhou et al. 2000; Després et al. 2000; Fu & Dong 2013), a la vez que reprime la expresión del gen *ICS1* (implicado en la síntesis de SA) en un ciclo de retroalimentación negativa (Zhang et al. 2010).

El mecanismo de activación del regulador NPR1 por SA es, por el momento, objeto de debate. Inicialmente, Fu et al., (2012) describieron la existencia de dos receptores con capacidad de unir SA con distinta afinidad : NPR3 (baja afinidad) y NPR4 (alta afinidad). Según este modelo, NPR4 activaría la degradación de NPR1 por el proteasoma, en condiciones basales, mientras que ante la detección de patógenos, la proteína NPR1 se despolimerizaría como consecuencia del cambio en el estado redox de la célula y entraría al núcleo en forma de monómeros. En estas circunstancias se inhibiría la unión del SA a la proteína NPR4 y en consecuencia la degradación de NPR1, mientras que en el núcleo la proteína NPR1 participaría en la activación de los factores TGA y en la activación de los genes de defensa durante la PTI y la defensa sistémica. Cuando la concentración de SA alcanza valores demasiado altos (durante la ETI) se uniría a NPR3 desencadenando la muerte celular que acompaña a la activación de la HR (Fu et al. 2012).

Sin embargo, en un trabajo publicado al mismo tiempo Wu et al., (2012) describieron que la proteína NPR1 puede unirse directamente al SA mediante un complejo que contiene Cu^{2+} y que causa la despolimerización y la activación de NPR1. Parece plausible, entonces, que dado que las tres proteínas NPR tienen afinidades distintas por el SA, cada una de ellas podría regular la activación de la respuesta de defensa de acuerdo a la concentración de la hormona marcando así las diferencias entre las respuestas locales PTI y ETI, y la respuesta sistémica (Boatwright & Pajerowska-mukhtar 2013).

1.1.7.2 Jasmonatos

Al igual que SA, la síntesis de JA comienza en los cloroplastos por la liberación de los ácidos linoleico (18:2) o linolénico (18:3) que son oxidados por la acción de las 13-lipoxigenasas (LOX2, LOX3, LOX4, LOX6) y en última instancia convertidos en JA (Bannenberg et al. 2009; Bell et al. 1995). Como parte de su acción, el JA es conjugado con isoleucina para generar su forma activa ((+)-7-iso-JA-Ile) que se une a la proteína COI1 que forma parte del complejo de ubiquitinación SCF^{COI1} . Esta interacción conduce a la unión y degradación de los represores constitutivos JAZ, liberándose la expresión de factores de transcripción (MYC2 es el más prominente) que inducen genes de defensa, involucrados en la protección de la planta frente a la infección de patógenos necrotrofos (Fonseca et al. 2009; Chini et al. 2009).

1.1.7.3 Etileno

El etileno constituye, junto al SA y el JA, el grupo de hormonas vegetales que regulan la activación de la respuesta de defensa de las plantas. Al ser una molécula pequeña y

encontrarse en estado gaseoso, el ET puede difundir fácilmente por la planta facilitando la comunicación entre las células durante la respuesta a estrés (Bleecker & Kende 2000). La ruta de transducción regulada por la acción del ET ha sido ampliamente caracterizada. Los receptores del ET se encuentran localizados en el retículo endoplásmico (Kendrick & Chang 2008) actuando como represores constitutivos de la ruta. A partir de la unión del etileno, se inhiben los receptores y el regulador negativo CTR1, lo que a su vez, activa a los reguladores positivos EIN2, EIN3, EIL1 y EIL2 que provocan la síntesis de factores de transcripción específicos de la respuesta a esta hormona tales como ERF1 que inducen la expresión de genes de defensa como por ejemplo PDF1.2 (Wang et al. 2002). Además, se ha descrito recientemente que EIN2 regula la respuesta a etileno a través del control de la traducción de genes de respuesta como *EBF2*, el cual influye a su vez en la expresión de factores de transcripción como *EIN3* y *EIL1* (Merchante et al. 2015), revelando la complejidad de la regulación de esta ruta a distintos niveles.

1.1.7.4 Interacción entre rutas hormonales en la defensa vegetal

El estudio de las rutas de señalización regulado por las hormonas de defensa de la planta han puesto de manifiesto que no actúan de forma independiente entre sí, sino que por el contrario existe un importante nivel de interacción entre ellas. De manera general, se ha descrito que el JA y el ET actúan de forma coordinada para favorecer la activación de la defensa frente a la infección de patógenos necrotrofos (Berrocal-Lobo et al. 2002; Lorenzo et al. 2003), mientras, que dicha interacción inhibe la activación de la ruta del JA asociada a la respuesta a herida y la defensa frente al ataque de herbívoros, de manera que el ET actúa canalizando la ruta de JA hacia su vertiente antimicrobiana (Anderson et al. 2004; Lorenzo et al. 2003; Pré et al. 2008).

Las rutas de señalización reguladas por la acción del SA y del JA, por el contrario, son mutuamente antagónicas. El SA es capaz de suprimir las respuestas mediadas por la acción del JA tanto, en relación a la protección de patógenos necrotrofos, como de insectos o heridas mecánicas (Koornneef & Pieterse 2008; Leon-Reyes et al. 2010). Recíprocamente, el JA reprime la inducción de los genes de respuesta a SA como por ejemplo del marcador PR1 (Pieterse et al. 2009). Los patógenos, por otro lado, han desarrollado estrategias de infección en las que aprovechan el antagonismo que se establece entre estas dos rutas de defensa para reprogramar la respuesta vegetal en su favor. El ejemplo más paradigmático a este respecto es el de la bacteria hemibiotrofa *Pseudomonas syringae*, con capacidad para producir una toxina (coronatina) estructuralmente análoga al conjugado JA-Ile que es incluso más activa que la

hormona vegetal para la ruta de transducción de la planta JA (Katsir et al. 2008; Yan et al. 2009). La inducción de esta señalización, provoca la supresión del cierre estomático inducido por los PAMPs, la PTI y la defensa apoplástica de la planta (Katsir et al. 2008; Brooks et al. 2005).

1.2 Oxilipinas

Los lípidos son moléculas esenciales para todas las formas de vida por la gran variedad de funciones que realizan. En particular, los lípidos de membrana tienen una importancia capital como componentes estructurales de las mismas, y como parte de los mecanismos de señalización y de transducción de las señales que se generan en ellas. Debido a su estructura química, los lípidos son especialmente sensibles a la oxidación, proceso en el que se generan moléculas más polares, denominadas oxilipinas, que al ser más hidrosolubles pueden liberarse al citosol. Estas características permiten, que las oxilipinas sean especialmente adecuadas para establecer la comunicación entre los procesos oxidativos de las membranas, y el interior celular, y en general para actuar como moléculas señalizadoras

En mamíferos se sintetizan varias clases de oxilipinas a partir de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, del inglés *poly unsaturated fatty acids*) entre las que las prostaglandinas y los leucotrienos actúan como señales reguladoras de la respuesta inmune y la inflamación (Funk 2001; Haeggström & Funk 2011). Igualmente, este tipo de derivados lipídicos se sintetizan en las plantas a partir de los ácidos grasos insaturados de las membranas, y su estudio ha permitido determinar la actuación de algunas de ellas como moléculas señalizadoras de procesos que conllevan cambios en el balance redox celular, entre otros la respuesta de defensa vegetal frente a la infección de patógenos.

1.2.1 Síntesis

La biosíntesis de oxilipinas se inicia mediante la oxidación de los ácidos grasos que se encuentran unidos a los lípidos de membrana, así como de ácidos grasos liberados de las membranas por la acción de lipasas. Esta reacción puede ocurrir de forma enzimática, mediante la acción de distintas enzimas que incorporan oxígeno en posiciones específicas de la cadena del ácido graso, entre las que las 9 y 13-lipoxigenasas (9-LOX y 13-LOX) y las α -dioxigenasas (α -DOX), contribuyen a la mayor parte de estas reacciones. Las enzimas 9-LOX y 13-LOX utilizan exclusivamente ácidos grasos poliinsaturados como sustrato, fundamentalmente linoleico (18:2) y linolénico (18:3), mientras que las α -DOX pueden oxidar una gama más amplia de ácidos grasos, incluyendo a los ácidos grasos saturados. En todos los

casos, los productos iniciales de la reacción son los correspondientes hidroperóxidos orgánicos, que son transformados, posteriormente, por una gran variedad de actividades enzimática secundarias tales como las propias lipoxigenasas, aleno óxido sintasas (AOS), divinil éster sintasas (DES), hidroperóxido liasas (HPL), peroxigenasas (PXG), epoxialcohol sintasas (EAS) y peroxigenasas/epóxido hidrolasas (PXG-EH) (Blée 1998; Blée 2002), dando lugar a la producción de una amplia familia de metabolitos, cuya actividad es en algunos casos desconocida. Además de las oxilipinas producidas de forma enzimática, existe otro grupo de moléculas, que se producen de forma no enzimática por la acción del oxígeno singlete o de radicales libres como el hidroxilo, generados como parte del estrés oxidativo asociado a distintas situaciones de estrés en la planta, o de manera basal en orgánulos como las mitocondrias y los cloroplastos con una gran actividad redox.

Los estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* han permitido identificar los genes que codifican las enzimas que catalizan la oxidación de ácidos grasos y que inician, por tanto, las rutas de síntesis de oxilipinas. Estos resultados han permitido identificar que, de los seis genes lipoxigenasa presentes en el genoma, dos de ellos designados *LOX1* y *LOX5*, codifican enzimas con actividad 9-lipoxigenasas, mientras que los cuatro restantes *LOX2*, *LOX3*, *LOX4* y *LOX6* corresponden a 13-lipoxigenasas; además, los genes *α-DOX1* y *α-DOX2* codifican enzimas con actividad α-dioxigenasas (Bannenberg et al. 2009).

1.2.2 Funciones

Los estudios realizados en los últimos años han puesto de manifiesto la importancia de las oxilipinas, así como su participación en la regulación de procesos relacionados con el desarrollo de la plantas y con la respuesta a estrés de tipo biótico y abiótico.

Los jasmonatos constituyen el grupo de oxilipinas mejor caracterizado, cuya síntesis se inicia por la acción de las 13-LOX, seguidas por reacciones de ciclización y β-oxidación (Creelman & Mullet 1997). En este subgrupo de oxilipinas, el ácido jasmónico constituye una de las fitohormonas mejor caracterizadas en cuanto a los procesos que regulan, así como a los procesos de señalización que determinan su actuación. Además de participar en la activación de respuestas de defensa (como ha sido detallado anteriormente), el JA regula la respuesta al daño mecánico, a las heridas producidas por el ataque de herbívoros o insectos y la maduración del polen, entre otras funciones (Creelman & Mullet 1997). Además del JA, se han caracterizado otros productos derivados de la ruta iniciada por la acción de las 13-LOX, que realizan funciones biológicas relevantes, tales como el ácido 12-oxo fitodienoico (OPDA), intermediario en la síntesis de JA, al que se le han asignado funciones propias durante la

activación de la defensa vegetal, en la respuesta a heridas y en la regulación del balance redox. Parte de las funciones específicas del OPDA se deben a la presencia en su estructura, de un grupo cetona α - β insaturado, lo que le confiere la capacidad de actuar como especie reactiva electrofílica (RES, del inglés *reactive electrophilic species*) (Taki et al. 2005). La presencia de este grupo reactivo, confiere actividad RES a otras oxilipinas tales como los fitoprostanos y el malondialdehído (MDA, ambos producidos de forma no enzimática), así como a determinados compuestos derivados de la ruta de las 9-LOX y 13-LOX, y a los que se les han asignado mecanismos de acción RES similares a los caracterizados para el OPDA. Entre otras oxilipinas producidas por la ruta de las 13-LOX para las que se han definido actividades diversas cabe mencionar el 13-HPOT, 13-HOT, *cis*-3-hexenol, *trans*-2-hexenal, para los que se ha determinado su participación como compuestos antimicrobianos (Prost et al. 2005).

La función de las oxilipinas sintetizadas a través de las rutas bioquímicas iniciadas por la acción las 9-LOX y las α -DOX está menos caracterizadas. Estudios realizados en el laboratorio han puesto de manifiesto el papel la proteína α -DOX1 en la defensa de la planta ante patógenos biotrofos y en la protección al daño generado por el estrés oxidativo asociado a esta respuesta (De León et al. 2002; Bannenberg et al. 2009; Hamberg et al. 2003). Por otro lado, el estudio con mutantes de pérdida de función de las actividades 9-LOX en *Arabidopsis*, ha demostrado la participación de estas enzimas, y por tanto de las oxilipinas correspondientes, en la activación de la respuesta de defensa frente a la infección de bacterias patógenas. La participación de esta ruta de biosíntesis en la defensa se establece a través de distintas oxilipinas, entre las que el ácido 9-keto octadecatrienoico (9-KOT) es el que posee mayor actividad defensiva. De hecho los estudios con este compuesto han puesto de manifiesto su actividad como mediador del cierre estomático inducido por PAMPs, actividad que al igual que mencionamos anteriormente para el OPDA, se debe a que sus características estructurales que le confieren capacidad para actuar como RES (Montillet et al. 2013). Por otro lado, y además de su actuación en la defensa estomática o pre-invasiva, el 9KOT actúa como activador de la defensa apoplástica, induciendo la expresión de genes de defensa a nivel local y sistémico en respuesta a la infección de *Pseudomonas* (Vicente et al. 2012).

Es interesante mencionar que, aunque las oxilipinas derivadas de las 9-LOXs, tales como por ejemplo 9-HOT y 9-KOT, se producen mediante la peroxidación “controlada” de lípidos, estos compuestos contribuyen a la protección de las membranas celulares frente a la peroxidación lipídica “descontrolada” que se produce como consecuencia del estrés oxidativo que acompaña a la respuesta de defensa vegetal. Esta función se basa en los resultados de estudios previos en los que se ha demostrado que el mutante *lox1lox5*, carente de actividad 9-

LOX, genera niveles más altos del marcador de peroxidación no-enzimática MDA que las plantas control y que dicho efecto se observa durante el establecimiento de interacciones compatibles e incompatibles (López et al. 2011). Aunque el exceso de MDA está asociado con el aumento de la susceptibilidad de las plantas *lox1/lox5* a la cepa virulenta *PstDC3000*, no se ha podido establecer si la protección de las membranas frente a la peroxidación es parte de la estrategia de defensa contra el patógeno, o un proceso paralelo de protección celular. En cualquier caso, es interesante pensar que las 9-LOX podrían actuar como reguladoras de la peroxidación lipídica y que sus productos constituyan señales para activar una respuesta antioxidante, de manera similar a los resultados descritos en mamíferos en relación a la ruta de respuesta a RES que se establece por la acción de las proteínas Keap1/Nrf2 (Dinkova-Kostova et al. 2005; Hong et al. 2005; Eggler et al. 2005). En apoyo de esta hipótesis cabe mencionar que la aplicación de 9-KOT provoca la inducción de genes relacionados con el estrés oxidativo en plantas silvestres (Vicente et al. 2012) y la reducción de esta respuesta en plantas *lox/lox5* frente al tratamiento con compuestos inductores de peroxidación lipídica (López et al. 2011).

A diferencia de lo que ocurre en la parte aérea de la planta, en la que la expresión de los genes 9-LOX se induce en respuesta a tratamientos exógenos, tales como la infección de patógenos, las raíces poseen niveles basales de expresión constitutiva y, en consecuencia, acumulan altos niveles de 9HOT y 9KOT (Velloso et al. 2007). La presencia de estos compuestos en la raíz contribuye al desarrollo radicular ya que su carencia, en los mutantes *lox1/lox5*, provoca la modificación del número de raíces laterales. Además, los estudios del laboratorio han puesto de manifiesto la participación de las 9-LOX en la defensa de la raíz a la presencia de patógenos radiculares y en concreto a la infección por el patógeno radicular *Fusarium oxysporum* (Ruth Marcos; resultados no publicados).

1.2.3 Interacción con fitohormonas

Parte de las funciones asignadas a las oxilipinas derivadas de la activación de las 9-LOXs han sido relacionadas con la acción de estos compuestos como moduladores de las rutas de señalización reguladas por determinadas hormonas vegetales. Así, por ejemplo, se ha comprobado que la aplicación exógena de oxilipinas en la raíz provoca la modificación de la pared celular y la aparición de un fenotipo radicular cuya inducción se establece como consecuencia de la acción de las oxilipinas como activadoras de la síntesis y la señalización de brasinoesteroides (Marcos et al. 2015). Igualmente, los estudios dirigidos a examinar la respuesta a las oxilipinas, han puesto de manifiesto el antagonismo entre las respuestas al

etileno (ET) y al 9HOT. Este antagonismo es recíproco, y afecta a respuestas tales como la acumulación de calosa, la peroxidación lipídica o el rizo radicular (López et al. 2011). Además, existen también evidencias experimentales que demuestran la acción combinada de las oxilipinas derivadas de las actividades 9-LOX y α -DOX como antagonistas de la ruta de señalización regulada por la acción del ácido abscísico (ABA) (Vicente et al. 2012).

Además de las interacciones descritas, cabe mencionar que las rutas de síntesis de oxilipinas interactúan entre sí, cooperando en la generación de compuestos oxigenados en dos posiciones distintas de su molécula, como es el caso de los enzimas 9-LOX y α -DOX, o por el contrario compitiendo por el mismo sustrato, como en el caso de las actividades 9-LOX y 13-LOX como se concluye de los resultados que muestran que el mutante *lox2*, defectivo en actividad 13-LOX, produce cantidades aumentadas de oxilipinas de la ruta 9-LOX en respuesta a la infección de *Pseudomonas* (Zoeller et al. 2012). En este sentido, y dado que las distintas rutas de síntesis participan en la defensa frente a distintos tipos de patógenos, el antagonismo de estos enzimas afecta a la respuesta defensiva de los distintos mutantes. Así por ejemplo, mientras que las plantas deficientes en actividad 9-LOX son más susceptibles a *Pseudomonas*, los mutantes *coi1*, deficientes en la señalización del JA, son más resistentes a este patógeno (Andrew et al. 2001).

1.2.4 Señalización

Los estudios realizados para caracterizar la ruta de señalización que regula la actividad defensiva de las oxilipinas derivadas de las 9-LOXs, permitieron seleccionar una serie de mutantes que fueron identificados en base a su incapacidad para inducir la respuesta de rizo radicular producida por el 9-HOT. Estos mutantes denominados *noxy* (del inglés *non responding to oxylipins*), han sido utilizados para identificar los componentes celulares que intervienen en la respuesta a estas oxilipinas, y definir los procesos de señalización implicados en la activación de la defensa vegetal mediada a través de estas señales lipídicas. El estudio y cartografiado molecular de algunos de estos mutantes, ha permitido establecer que los procesos de señalización de la ruta 9-LOX están relacionados fundamentalmente con dos tipos de actividades o funciones celulares. En primer lugar, tres de los mutantes identificados *noxy2*, *noxy15* y *noxy38*, corresponden a proteínas mitocondriales que contribuyen a la señalización de la presencia de patógenos, así como a la del daño en la pared celular (Vellosillo et al. 2013). En segundo lugar, cuatro de los mutantes identificados, designados como *noxy7*, *noxy50*, *noxy54* y *noxy23* corresponden a genes relacionados con la regulación de la traducción de los ARNm. Además de contribuir al conocimiento de los procesos de señalización de las 9-LOX,

estos resultados ponen de relieve la importancia de la función mitocondrial y de la traducción en la defensa de la planta, dos mecanismos hasta ahora poco estudiados en este campo.

1.2.5 NOXY7

La identificación previa del mutante *noxy7* en el laboratorio (anteriormente nombrado como *noxy76*, (Kulasekaran 2012)) permitió determinar su localización al final del 21^{er} intrón del locus At1g64790, y que el cambio de nucleótido responsable de esta mutación provoca la retención del mismo (78 pb) y, por tanto, una forma de procesamiento alternativo del mensajero correspondiente, cuya traducción genera una proteína que contiene una inserción de 26 aminoácidos, manteniendo el mismo marco de lectura de la proteína NOXY7 original (Fig. 1) (Kulasekaran 2012). El gen At1g64790 codifica para una proteína de 2610 aminoácidos con repeticiones de dominios HEAT en una estructura de tipo armadillo (ARM) que fue designada, originalmente, como ILITHYIA (ILA, diosa griega de la fertilidad), debido a que su mutación provoca una alta tasa de inviabilidad embrionaria (Johnston et al. 2007). Las estructuras de tipo ARM constituyen superhélices formadas por dos capas de hélices curvadas, en las que las repeticiones que las integran (en este caso, repeticiones HEAT) se ordenan alrededor de un eje común. Este tipo de estructura genera una amplia superficie, adecuada para la unión de sustratos voluminosos tales como ácidos nucleicos o proteínas (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR016024>).

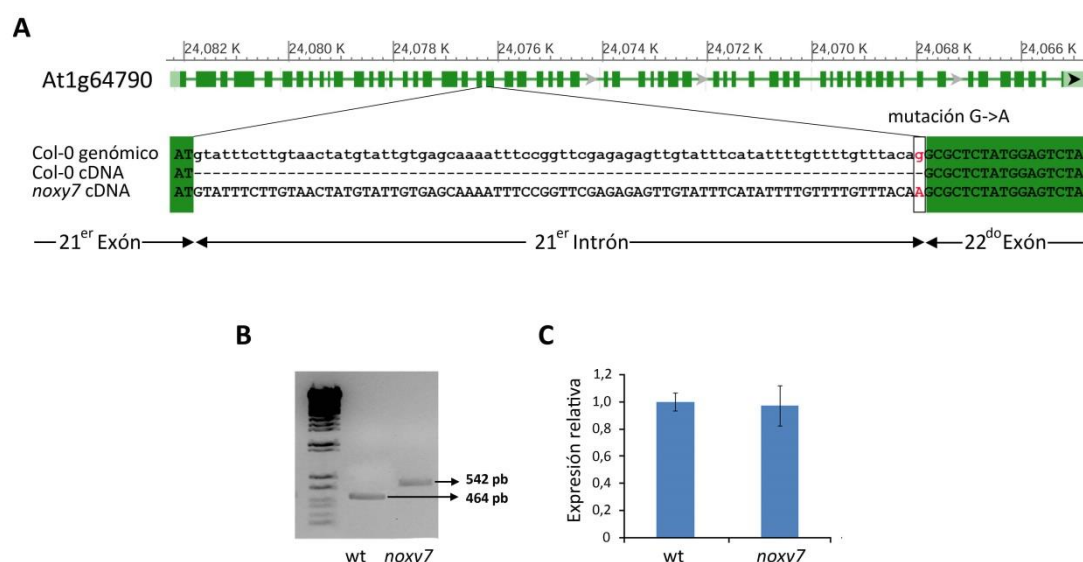


Figura 1. Identificación de la mutación *noxy7*. (A) Posición de la mutación *noxy7* en el extremo 3' del intrón 21 del locus At1g64790. (B) Amplificación mediante RT-PCR del ARN procedente de plántulas silvestres (Col-0) y mutantes *noxy7* en la que se muestra la retención del intrón 21 en el mutante *noxy7*. (C) Nivel de expresión del transcrito *NOXY7* en plántulas silvestres y mutantes *noxy7*.

At1g64790/ILA es el ortólogo del gen *GCN1* de levaduras, que forma parte de un sistema de regulación de la síntesis de proteínas ampliamente caracterizado en estos organismos, cuya actividad contribuye a la adaptación de las levaduras a situaciones de estrés relacionadas con la carencia de nutrientes (Castilho et al. 2014).

1.2.5.1 El sistema GCN1-GCN2-GCN20 de regulación de síntesis de proteínas

La función de la proteína GCN1 ha sido ampliamente examinada en levaduras, utilizando como modelo el estudio de la respuesta de adaptación a la carencia de aminoácidos, respuesta frente a la que las levaduras se adaptan inhibiendo la síntesis de proteínas para reducir el consumo de aminoácidos, aumentando de forma paralela la expresión de los genes que participan en la síntesis de aminoácidos (Fig. 2).

1.2.5.2 El complejo GCN1-GCN2-GCN20 participa en la fosforilación de eIF2 α

Los estudios llevados a cabo en levaduras han permitido determinar que, en respuesta a una disminución en la concentración y la disponibilidad de algún aminoácido, se produce una bajada en el nivel de conjugación del mismo con su correspondiente ARN de transferencia (ARNt) que conduce, a su vez, al aumento de los niveles de ARNt vacíos. El acceso de los ARNt vacíos al ribosoma provoca la activación de la quinasa GCN2, integrante del complejo regulador GCN1-GCN2-GCN20 y, como consecuencia, la fosforilación de la subunidad alfa del factor de iniciación de la traducción eIF2 (eIF2 α) (Fig. 2A) (Dever et al. 1992; Wek et al. 1995; Castilho et al. 2014). La forma fosforilada del factor eIF2 α (eIF2 α -P) provoca la disminución de la síntesis de proteínas y estimula, a la vez, la traducción de los transcritos *GCN4* codificantes del factor de transcripción GCN4 que regula la expresión de los genes implicados en la síntesis y en el transporte de aminoácidos (Fig. 2B). De esta forma, ante la disminución de aminoácidos en el medio, las células de levadura responden, por una parte inhibiendo la síntesis de proteínas y por otra, aumentando la síntesis de aminoácidos a partir de sus precursores en un proceso conocido como respuesta GAAC (del inglés *general amino acid control*) (Hinnebusch 2005).

La importancia de la proteína GCN1 en este proceso radica en su actuación como anclaje para facilitar la unión del complejo GCN1-GCN2-GCN20 al ribosoma, al que se une por una amplia zona que se extiende desde la región N-terminal hasta unos 2/3 de su secuencia (Sattlegger & Hinnebusch 2000; Garcia-Barrio et al. 2000). Además, la proteína GCN1 podría facilitar el acceso del ARNt vacío al sitio A del ribosoma, o el reconocimiento de dicho ARNt vacío por parte de la quinasa GCN2. En cualquier caso, la proteína GCN1 es imprescindible para

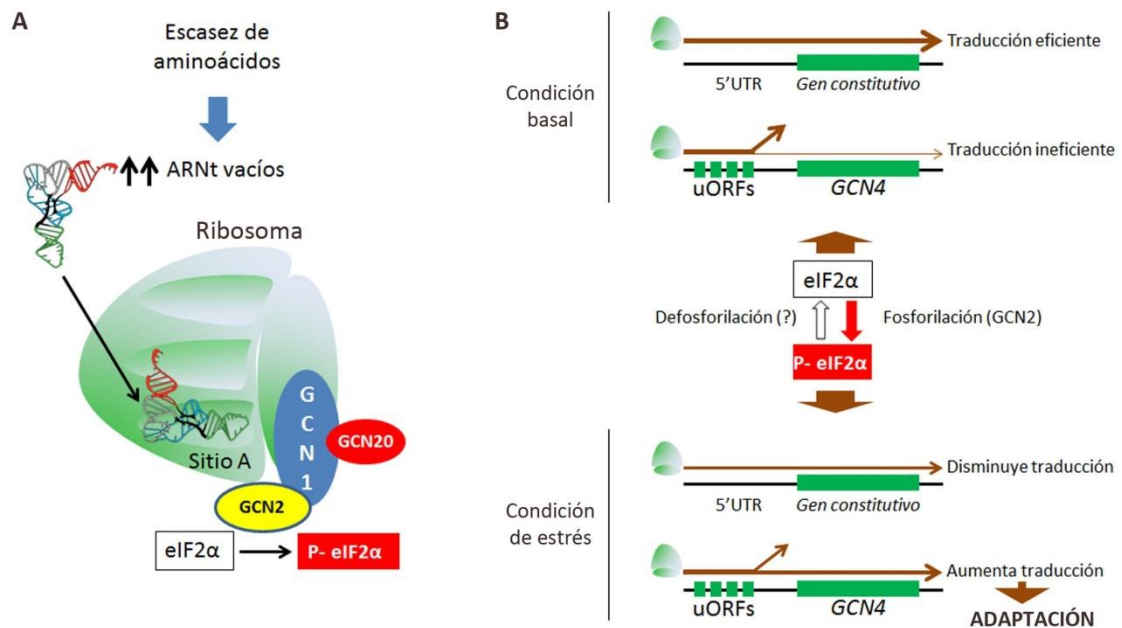


Figura 2. Modelo general de la respuesta GAAC en levaduras. (A) Las proteínas GCN1, GCN2 y GCN20 forman parte de un complejo proteico unido a la subunidad pequeña del ribosoma. Los ARNt vacíos que se generan como consecuencia de la escasez de aminoácidos, acceden al sitio A del ribosoma donde interactúan con la quinasa GCN2, por mediación de las proteínas GCN1 y GCN20. La activación de la quinasa GCN2, tras la unión al ARNt vacío, provoca la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2α. (B), En condiciones basales, la mayor parte del factor eIF2α se encuentra defosforilado permitiendo la traducción de la mayoría de los mensajeros celulares. En estas condiciones el nivel de la traducción de los transcritos *GCN4* es muy bajo debido a la presencia de 4 uORFs pequeñas, situadas aguas arriba del ORF principal, cuya traducción provoca el desensamblaje prematuro del ribosoma. En condiciones de estrés nutricional, la fosforilación del factor eIF2α interfiere con la formación del complejo ternario, causando la inhibición global de la traducción. De forma paralela, la capacidad de reconocimiento de los uORF por parte del ribosoma disminuye, por lo que aumenta la probabilidad de que el ORF principal del transcrito *GCN4* se traduzca, en cuyo caso, y dada la función de la proteína GCN4 como regulador transcripcional de los genes de síntesis de aminoácidos, se recupera el nivel de aminoácidos en la célula y se favorece la adaptación.

la activación de GCN2 y la fosforilación de eIF2α en la inmensa mayoría de condiciones de estrés examinadas (Sattlegger & Hinnebusch 2000; Castilho et al. 2014; Kubota et al. 2000; Marton et al. 1993). Finalmente, el tercer miembro del complejo, la proteína GCN20, ha sido caracterizada como una proteína ABC citosólica que se une a la zona central de la proteína GCN1 favoreciendo su unión al ribosoma. La proteína GCN20 es necesaria para la activación de la quinasa GCN2 también en la mayoría de condiciones experimentales (Vazquez de Aldana et al. 1995; Yang et al. 2000; Castilho et al. 2014).

1.2.5.3 Mecanismo de inhibición general y de activación de GCN4

El factor eIF2 es esencial para la traducción de ARNm ya que forma parte del complejo ternario de iniciación eIF2-ARNT(Met_i)-GTP. Este complejo se une al ARNm, junto a otros factores de iniciación y a la subunidad pequeña del ribosoma (40S), para dar lugar al complejo de pre-iniciación de la traducción (48S), que “escanea” el ARNm en busca del codón de iniciación de la traducción. Una vez identificado, se produce la hidrólisis de GTP-eIF2 a GDP-eIF2 para permitir el acoplamiento codón-anticodón del ARNT-Met_i, seguido de la unión de la subunidad mayor del ribosoma (60S) y del comienzo de la fase de elongación de la traducción (Sonenberg & Hinnebusch 2009).

En condiciones basales, y tras este proceso, el factor eIF2 queda unido a GDP, que se intercambia rápidamente por GTP (mediante la participación del factor eIF2B) para volver a generar un nuevo complejo ternario, que se incorporará a un nuevo ciclo de iniciación. En condiciones de escasez de aminoácidos, la fosforilación de la subunidad eIF2 α por la acción de la quinasa GCN2, impide el reciclaje GDP/GTP y, por tanto, la formación y disponibilidad del complejo ternario, cuya limitación provoca la inhibición de la iniciación de la traducción y la reducción global de la síntesis de proteínas (Sonenberg & Hinnebusch 2009; Hinnebusch 2005).

Una cuestión central en este circuito de regulación traduccional es el hecho de que, a la vez que se reprime la traducción global de ARNms, se favorece la del factor transcripcional GCN4. El análisis del ARNm correspondiente al gen *GCN4* puso de manifiesto la presencia de cuatro pequeños marcos abiertos de lectura en la región 5' no traducida (5'UTR, del inglés 5' *untranslated*) del mensajero, denominados uORF (del inglés *upstream Open Reading Frames*) (Abastado et al. 1991). En condiciones basales, el ribosoma escanea al mensajero *GCN4* y utiliza el uORF1 para la iniciación, elongación y terminación de la síntesis de un péptido de pequeño tamaño. En este punto la subunidad 40S no se ha disociado todavía de los factores de iniciación, de manera que no solo no se desensambla, sino que sigue escaneando el ARNm hasta unir un nuevo complejo ternario y encontrar un segundo ORF en un nuevo proceso de iniciación, que usualmente traducirá el uORF2 o uORF3, después de lo cual el ribosoma se desensambla evitando la traducción del ORF principal del mensajero, que codifica la proteína GCN4. De esta manera, la síntesis del factor de transcripción GCN4 se encuentra constitutivamente reprimida (Fig. 2B). Sin embargo, en condiciones de escasez de aminoácidos, al disminuir el nivel de complejo ternario, se reduce la probabilidad de que el ribosoma disponga de un nuevo complejo ternario antes de alcanzar los uORF2-4 de manera

que se favorece la llegada del ribosoma al codón de iniciación de la proteína GCN4 (Fig. 2B) (Abastado et al. 1991; Lu et al. 2004).

1.2.5.4 La respuesta GAAC en otros organismos

El mecanismo descrito constituye un sistema de regulación exquisito con capacidad para percibir el estatus nutricional, y responder al mismo a través del control traduccional. Además de en levaduras, existen numerosas evidencias experimentales que demuestran que este mecanismo de regulación actúa en otros organismos. En mamíferos, por ejemplo, el complejo ha evolucionado de manera que existen cuatro eIF2 α quinasas que responden cada una a formas específicas de estrés, si bien existe cierto solapamiento en las respuestas. Así, además de quinasa GCN2, implicada en la respuesta al estrés nutricional, se ha descrito la existencia de la quinasa HRI que regula la respuesta a la reducción de los niveles de grupo hemo en eritrocitos, la quinasa PRK que se activa en respuesta a la presencia de ARN de doble cadena presente en la infección por virus y la quinasa PERK que responde a la presencia de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (Wek et al. 2006). Las cuatro quinasas descritas en mamíferos catalizan la fosforilación del factor eIF2 α en el mismo aminoácido que la quinasa GCN2 de levaduras, induciendo igualmente la inhibición global de la traducción. De la misma manera, se han identificado en mamíferos los ortólogos funcionales de *GCN1* y *GCN4* (este último denominado *ATF4*), aunque no de *GCN20* (Vattem & Wek 2004; Lu et al. 2004; Castilho et al. 2014). Cabe destacar que la quinasa GCN2 de mamíferos participa también en procesos que no están relacionados de manera obvia con el estatus nutricional, tales como la proliferación de células T, la memoria antigénica y proliferación de células tumorales (Castilho et al. 2014).

En *Caenorhabditis elegans*, el estrés hipertónico activa la quinasa GCN2 en un proceso de adaptación necesario para su supervivencia en estas condiciones, mientras que los ortólogos de GCN1 y GCN20 participan en la fosforilación del factor eIF2 α e intervienen en procesos de muerte celular (Hirose & Horvitz 2014). En *Drosophila*, la quinasa GCN2 podría tener un papel en el desarrollo embrionario (Malzer et al. 2013).

Dado que la regulación de la síntesis de proteínas es un proceso esencial para el mantenimiento celular, no es sorprendente que el sistema de regulación basado en la fosforilación del factor eIF2 α se encuentre conservado a lo largo de la evolución y que haya sido adaptado en cada caso para participar en las respuestas adaptativas de cada tipo de organismo.

1.2.5.5 La respuesta GAAC en plantas

De forma general, el conocimiento de los procesos de regulación de la traducción en plantas es mucho más limitado que en mamíferos o levaduras. De hecho, aunque existen evidencias de que ocurre fosforilación de eIF2 α en el reino vegetal, las implicaciones de este proceso son poco conocidas.

En *Arabidopsis* existe una única quinasa AtGCN2, que fosforila *in vitro* a las dos isoformas existentes del factor eIF2 α (At2g40290 y At5g05470). Ambas isoformas son casi idénticas entre sí, y al compararlas con ortólogos distantes evolutivamente es evidente que el residuo de serina fosforilado y la región adyacente se encuentran muy conservados, sugiriendo un esquema regulatorio similar al descrito en otros organismos (Li et al. 2013). Resultados recientes (Wang et al. 2016) han confirmado que AtGCN1 es también necesario para la fosforilación de eIF2 α , además de su interacción con AtGCN2 en un ensayo de doble híbrido.

Por otra parte, se ha descrito que la quinasa AtGCN2 cataliza la fosforilación del factor eIF2 α *in vivo* en respuesta al tratamiento con inhibidores de la síntesis de aminoácidos tales como clorosulfurón (que inhibe la síntesis de Ile, Leu, Val), glifosato (inhibidor de la producción de Phe, Tyr, Trp) e IRL1803 (inhibidor de la síntesis de Hys) (Zhang et al. 2008). En consonancia, los mismos autores han descrito que el gen AtGCN2 favorece la respuesta adaptativa de las plántulas de *Arabidopsis* a dichos inhibidores. Sin embargo, en este mismo estudio, no se pudo encontrar una correlación entre la expresión de genes de síntesis de aminoácidos en respuesta a dichos inhibidores y la presencia del gen AtGCN2.

Sorprendentemente, en un trabajo posterior (Faus et al. 2015) se describió que en plantas adultas el gen AtGCN2 promueve la sensibilidad a la aplicación de glifosato en lugar de su adaptación a este herbicida. Los autores sugieren que la contradicción con los resultados del trabajo de Zhang et al. (2008) podría estar relacionada con el hecho de utilizar plantas en distintos estadios de desarrollo, aunque aun así, tampoco pudieron reproducir los resultados de estos últimos en las plántulas. Estos resultados, junto con el hecho de que hasta el momento no se ha descrito un ortólogo del gen GCN4 en *Arabidopsis*, no ha permitido establecer una relación clara entre la quinasa GCN2, la fosforilación del factor eIF2 α y la adaptación de las plantas a la carencia de aminoácidos. Independientemente de esto, es probable que en plantas existan circuitos de regulación mediados por uORF, como sugiere el hecho de que, tanto en *Arabidopsis*, como en arroz, los uORF se encuentran preferentemente asociados a mensajeros que codifican factores de transcripción (Hayden & Jorgensen 2007).

Además de su participación en la adaptación de las plantas a la carencia de aminoácidos, se ha descrito la participación de la proteína AtGCN2 en la fosforilación de eIF2 α en otras respuestas de estrés tales como la luz ultravioleta, la herida, la inhibición de la síntesis de purinas, así como en respuesta a moléculas señalizadoras tales como el ácido salicílico, el ácido jasmónico y el precursor de la síntesis de etileno 1-aminopropano-1-carboxílico (Lageix et al. 2008) aunque en ninguno de estos casos se han determinado las implicaciones funcionales o adaptativas del proceso.

En cuanto a GCN1 y GCN20, que junto a GCN2, integran el complejo proteico responsable de la fosforilación de eIF2 α de levaduras, la información disponible acerca de su función fuera de este organismo es muy limitada. Como mencionamos más arriba, la participación de GCN1 en la fosforilación de eIF2 α de *Arabidopsis* ha sido descrita recientemente en un trabajo en el que se postula su participación en la respuesta de adaptación al frío (Wang et al. 2016). A parte de esto, el resto de los trabajos referentes a la funcionalidad de GCN1 y GCN20 en *Arabidopsis* han demostrado su participación en la respuesta de defensa frente a la infección de patógenos biotrofos (Monaghan & Li 2010; Zeng et al. 2011).

De hecho, de los tres alelos de *AtGCN1/ILA* identificados en *Arabidopsis*, denominados *ila-1*, *ila-2* e *ila-3*, dos de ellos *ila-1* e *ila-2* contienen una inserción de T-DNA hacia la mitad de la secuencia del gen que conlleva importantes alteraciones fenotípicas dando lugar a plantas enanas que manifiestan una clorosis marcada e infertilidad masculina, mientras que la inserción de T-DNA en el alelo *ila-3* se encuentra insertada al final de la secuencia produciendo cambios fenotípicos más suaves tales como una clorosis suave en las hojas emergentes y fertilidad no tan reducida (Monaghan & Li 2010). Estas circunstancias han permitido examinar la respuesta a la infección con *Pseudomonas* y comprobar que la mutación *ila-3* interfiere con la activación de la defensa local y sistémica que se activa en respuesta a la presencia de esta bacteria, generando por tanto un fenotipo de susceptibilidad. Es importante mencionar que la susceptibilidad del mutante *ila-3* no está acompañada de una alteración en la producción de SA o de su señalización, sugiriendo que la función de *AtGCN1/ILA* en la activación de la respuesta de defensa es independiente de esta fitohormona (Monaghan & Li 2010).

En el mismo contexto es importante mencionar que un mutante *gcn20* de *Arabidopsis* se identificó en un escrutinio genético dirigido al aislamiento de mutantes defectivos en el cierre estomático frente la presencia de *Pseudomonas*. De hecho este mutante, denominado *scord5* (del inglés *sensitive to coronatin-deficient 5*) presenta un defecto en el cierre estomático en respuesta a la cepa de *Pseudomonas syringae* PstDC3118, deficiente en la producción de la

toxina coronatina implicada en la reapertura de los estomas, inducida por este patógeno durante la infección (Zhao et al. 2003). De acuerdo con los resultados descritos para la mutación *ila-3*, el mutante *gcn20/scord5* produce el cierre estomático en respuesta a la aplicación de SA y presenta una alteración en la producción de esta fitohormona. Estudios posteriores, permitieron comprobar que al igual que *gcn20/scord5*, el mutante *ila-3* es también defectivo en el cierre estomático (Zeng et al. 2011). Estos resultados sugerían la relación funcional de las proteínas *AtGCN1/ILA* y *AtGCN20/SCORD5* y por tanto la participación del complejo GCN1-GCN2-GCN20 de *Arabidopsis* en la regulación de la inmunidad en un proceso independiente de la ruta de defensa regulada por la acción del SA.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo general profundizar en el conocimiento de los procesos de señalización activados por las oxilipinas producidas por la ruta de síntesis iniciada por los enzimas 9-lipoxigenasas, como parte de su función en la activación de la respuesta de defensa vegetal frente a la infección de microorganismos patógenos. De forma particular, hemos centrado nuestro estudio en los procesos de regulación de la síntesis de proteínas en respuesta a diversos tipos de estrés y en su relación con la actividad de los oxilipinas de interés. Para ello hemos procedido a la caracterización del mutante *noxy7*, aislado en un escrutinio genético dirigido a la identificación de mutantes de *Arabidopsis* afectados en la señalización de oxilipinas, y que había sido descrito como muy susceptible a la bacteria *Pseudomonas syringae*. La mutación *noxy7* había sido localizada en el locus At1g64790, que codifica para el homólogo del regulador traduccional de levaduras GCN1. Por ello, decidimos usar este mutante para examinar el papel de la regulación de la síntesis de proteínas durante la activación de la defensa vegetal y otras formas de estrés. Además, procedimos a examinar la conservación funcional de NOXY7 como homólogo de GCN1, así como la de las proteínas GCN2 y GCN20 de *Arabidopsis*, cuyos homólogos en levaduras participan en el mismo sistema de regulación traduccional.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material Biológico

3.1.1 Material Vegetal

Este estudio se ha realizado con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, ecotipos silvestres Columbia-0 (Col-0) y Landsberg *erecta* (Ler). Se usaron además las siguientes plantas mutantes con inserción de ADN-T de las colecciones SALK (Alonso et al. 2003) y GABI-KAT (Kleinboelting et al. 2012), derivadas del ecotipo Col-0 y obtenidas del *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC): *gcn2* (SALK_032196), *ila3* (SALK_041123), *gcn20* (GABI-KAT 188G03), *abi1-2* (SALK_72009), *l2b* (GABI-KAT 050E10), *l30e1* (SALK_209120C) y *l30e2* (SALK_205722C). El mutante *noxy7* fue obtenido en el laboratorio a partir de la mutagénesis de plantas Col-0 (Velloso et al. 2007). Además, se usaron plantas mutantes *gcn2* derivadas del ecotipo Ler (*gcn2^{Ler}*, línea GT8359, Laboratorio Cold Spring Harbor) con una inserción del elemento transponible Ds.

3.1.2 Especies bacterianas fitopatógenas

Durante este estudio se utilizó el patógeno modelo *Pseudomonas syringae*, específicamente las cepas *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300 (*Pst* DC3000) (Whalen et al. 1991), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300 *avrRpm1* (Debener et al. 1991) y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC300 *COR* AK87 (Brooks et al. 2005).

3.2 Crecimiento de las plantas

3.2.1 Crecimiento de plántulas in vitro

Para su utilización *in vitro* las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron esterilizadas con una mezcla de lejía 75% y Tween-20 0,1%, con agitación frecuente durante 7 min, seguido de cuatro lavados con agua MilliQ estéril. Las semillas así esterilizadas se mantuvieron en oscuridad a 4°C por al menos 48h para su estratificación. La germinación de las semillas se produjo siempre en medio de cultivo sólido MS 0,5X (Murashige & Skoog 1962) suplementado con sacarosa al 1% y usando agar como agente gelificante. Para el crecimiento en posición vertical, la concentración de agar usada fue del 1,5 % mientras que para el crecimiento en horizontal fue del 0,7 %. Las placas se sellaron con cinta Micropore porosa (3M Health care, St. Paul MN, USA) y se crecieron en cámaras climáticas a 21°C y 50% de humedad relativa.

Para la observación de los fenotipos las semillas fueron germinadas directamente en medio MS horizontal suplementado con los siguientes productos: clorosulfurón (CHL) 5 nM, fosfinotricina (PPT) 10 μ M, ditioneitol (DTT) 1mM, antimicina A (AA) 5 μ M o ácido bórico (250 μ M, 500 μ M o 1 mM). Los fenotipos fueron evaluados 14 días después de la germinación. En su caso, se computó el peso fresco o la supervivencia promedio de las plántulas en estas condiciones.

Para observar la respuesta fenotípica de raíces las plántulas fueron germinadas en medio MS vertical y pasadas después de 4 días a placas en las mismas condiciones, suplementadas con los siguientes productos: 9KOT (25 μ M), 9HOT (25 μ M), OPDA (5 μ M), JA (20 μ M), Ácido 9-oxo-nonanoico (9-Oxo, 20 μ M) o ácido abscísico (ABA, 10 μ M o 20 μ M). Los fenotipos fueron evaluados en la zona de la raíz a partir del pase de las plántulas. En su caso, se midió el crecimiento de las raíces con el programa ImageJ (<http://imagen.net>).

3.2.2 Crecimiento de las plantas en tierra

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se sembraron en bandejas de alveolos sobre una mezcla de tierra con vermiculita en proporción 3:1. Las bandejas se cubrieron con plástico y se estratificaron a 4°C durante tres días. Posteriormente, las plantas se crecieron en el invernadero o en cámaras de cultivo con 14h de luz, temperatura de 21°C y humedad relativa del 60%. A los 3 días de germinación los plásticos utilizados para preservar la humedad se retiraron para continuar el crecimiento de las plantas.. Tanto para los tratamientos de sequía, infección o respuesta estomática se utilizaron plantas de 4 semanas de edad.

3.3 Crecimiento y mantenimiento de microorganismos

Medio Luria-Bertani (LB): Para el crecimiento de *E. Coli*, conteniendo 1% de bacto triptona, 0,5% de extracto de levadura y 1% de cloruro sódico (NaCl) suplementado, en su caso, con los antibióticos correspondientes. Para medio sólido se añadió 1,5% de agar como agente gelificante.

Medio King's B (KB): Para el crecimiento de *Pseudomonas*, conteniendo 2% proteosa peptona, 2% glicerol, 6,5 mM K_2HPO_4 y 6 mM $MgSO_4$ suplementado, en su caso, con los antibióticos correspondientes. Para medio sólido se añadió 1,5% de agar como agente gelificante.

3.4 Aislamiento de líneas homocigotas con inserciones de ADN-T

Las líneas de inserción de ADN-T obtenidas del NASC fueron genotipadas mediante PCR para comprobar la presencia de la inserción. Se aisló ADN genómico de plantas individuales y se hicieron dos PCR distintas: la primera, con los oligonucleótidos del gen endógeno que flanquean la inserción; la segunda, con un oligonucleótido del gen endógeno y otro del borde del ADN-T insertado. La combinación del resultado de ambas reacciones permitió conocer el genotipo de cada planta

En el caso de las líneas obtenidas de la colección GABI-KAT, la inserción de ADN-T confiere resistencia a sulfadiazina, por lo que el genotipado fue precedido de la selección de plantas en medio MS-agar horizontal suplementado con este antibiótico. La segregación del carácter resistente fue indicativo del genotipo de las líneas, que fue confirmado posteriormente mediante PCR. Los cebadores usados en el genotipado fueron los recomendados en la herramienta SiGnAI (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>).

3.5 Tratamiento de las plantas

3.5.1 Estrés hídrico

Para simular condiciones de sequía se utilizaron plantas de 4 semanas crecidas en tierra en condiciones de riego normal (40 ml de agua por planta y semana). En este punto se cortó el riego y se evaluaron los síntomas de sequía 10 días después.

3.5.2 Infección con *Pseudomonas syringae*

Previo a la inoculación de *Pseudomonas syringae*, la cepa fue refrescada en placas de KB en presencia de los antibióticos necesarios. En este punto, las células fueron recogidas con una solución estéril de MgCl_2 10 mM, y diluidas en esta misma solución hasta la concentración usada para la infección, considerando que una suspensión de $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1$ corresponde a 10^8 UFC/ml.

Para la infección por infiltración se usaron plantas bien regadas, crecidas en tierra durante 4 semanas. En este caso se infectaron tres hojas adultas del mismo verticilo por planta, aplicando la bacteria directamente al apoplasto utilizando una jeringuilla de 1 ml sin aguja y aplicando la suspensión bacteriana en la cara abaxial de la hoja. La concentración de bacterias

utilizada fue de 10^5 UFC/ml para la evaluación del crecimiento bacteriano *in planta*, y de 10^6 UFC/ml para tratamientos en los que se extraerían ARN o proteínas, posteriormente.

En la infección por aspersión se utilizaron plantas crecidas en las mismas condiciones. La inoculación en este caso se realizó por aspersión uniforme sobre las plantas de una solución de bacterias a una densidad de 10^8 UFC/ml y usando un vaporizador. En este caso, además, se añadió el agente surfactante comercial Silwet L-77 (OSi Specialties) al 0,04% (V/V) para facilitar la formación de una capa uniforme de solución bacteriana sobre las hojas. Las plantas fueron colocadas en bandejas con tapa transparente para la conservación de la humedad durante 24h. Después de este tiempo las tapas fueron retiradas hasta la evaluación de los síntomas y el crecimiento bacteriano.

3.5.3 Evaluación de crecimiento bacteriano *in planta*

El crecimiento bacteriano *in planta* fue evaluado según se describe en (Whalen et al. 1991), con modificaciones. Se infectaron seis plantas por genotipo/tratamiento, bien mediante infiltración (10^5 UFC/ml) o aspersión (10^8 UFC/ml). De cada planta se recogieron 3 hojas, hasta un total de 18. De cada hoja se cortó un disco ($\sim 0,3 \text{ cm}^2$) y se formaron al azar 6 grupos de 3 discos cada uno, de forma que cada grupo constituye una unidad experimental.

Cada grupo de 3 discos fue colocado en 500 μl de MgCl_2 10 mM y fue triturado en un homogeneizador (Retsch) con la ayuda de unas 10 cuentas de cristal, de 2 mm de diámetro, por cada tubo. La cantidad de bacterias se determinó plaqueando diluciones seriadas del homogeneizado en placas de medio KB conteniendo los antibióticos necesarios.

3.5.4 Evaluación de la respuesta de cierre estomático

Se recogieron hojas adultas en el mismo estadio de desarrollo y se colocaron en tampón de apertura estomática (50 mM KCl, 10 mM MES, 0,1 mM CaCl_2) durante 2 h en placas de cultivo de 6 pocillos (Falcon), para asegurar que los estomas estuvieran abiertos antes del tratamiento (Melotto et al. 2006). A continuación se añadieron los productos/bacterias de interés y después del tiempo requerido se pelaron las epidermis de la cara abaxial y se examinaron al microscopio. Para cada tratamiento se fotografiaron al menos 50 estomas y se midió en cada caso la apertura (largo y ancho) del poro de los estomas utilizando el programa ImageJ (<http://imagenet.net>). La apertura estomática se definió como la razón ancho/largo del poro.

3.5.5 Tratamiento de plántulas *in vitro*

Para efectuar tratamientos *in vitro* dirigidos al análisis de ARN o proteínas, se germinaron las semillas en placas de MS verticales. Después de 7-8 días, se transfirieron a medio MS líquido por 24h, y luego se trataron con 500 nM CHL, 200 μ M PPT, 10 mM DTT, 20 μ M AA, 20 mM ácido bórico, 1mM SA, 25 μ M 9HOT, 25 μ M 9HOT, 25 μ M OPDA, 25 μ M JA o 20 μ M ABA. Después de los tiempos correspondientes, las plántulas fueron congeladas en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

3.6 Tinción de calosa

La acumulación de calosa en respuesta a 9-HOT se identificó mediante tinción de azul de anilina. Se sumergieron las raíces de plántulas tratadas (o controles) en una solución 0,1 mg/ml de azul de anilina (SiroBiosupplies, Australia) durante 30 min, en oscuridad. Después de lavar con agua para eliminar el exceso de fluoróforo, las raíces se observaron al microscopio con luz ultravioleta. Los acúmulos de calosa teñidos aparecían como puntos azul claro con un brillo intenso.

3.7 Evaluación de tasa de síntesis de proteínas

La tasa de síntesis *de novo* de proteínas se evaluó mediante la incorporación de una mezcla de los aminoácidos (Met/Cys) marcadas con el isótopo radioactivo ^{35}S (Lageix et al. 2008). Alrededor de diez plántulas de 7-8 días, germinadas en placas de MS-agar vertical, se pasaron a 1 ml de medio MS líquido en placas de cultivo de 12 pocillos (Falcon) y se mantuvieron durante la noche en este medio para favorecer su adaptación. En este punto se adicionaron al mismo los productos correspondientes al tratamiento ensayado en cada caso, y 2 h antes del fin del tratamiento se adicionaron además 30 μ Ci de la mezcla ^{35}S -Met/Cys. En el momento de colección de las muestras se retiró el medio, se lavaron las plántulas con agua estéril para eliminar el exceso de marcaje no incorporado, y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido.

De estas muestras se extrajeron proteínas totales y se separaron 30 μ g por muestra mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, del inglés *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*) según se describe más adelante. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie para comprobar el nivel de proteínas totales por muestra, y posteriormente se secaron al vacío con un secador de geles (DrygelSr, Hoefer Scientific Instruments) y se

expusieron a películas fotográficas (Konica Minolta) durante la noche para obtener la autorradiografías de ^{35}S correspondientes a las proteínas sintetizadas *de novo* durante el tiempo de exposición al marcaje.

Las películas radiográficas fueron escaneadas en escala de grises, y la intensidad de las bandas de cada carril fue estimada con la herramienta *Histogram*, del programa Photoshop (Adobe). Se restó en cada caso la intensidad del fondo, calculada a partir de las porciones de la foto correspondientes a las zonas del gel sin cargar. Para cada tratamiento, se calculó la tasa relativa de incorporación como la razón entre la intensidad del carril de la muestra, respecto a un control sin tratar, cargado en el mismo gel. Se registró para cada tratamiento la media correspondiente a al menos tres réplicas biológicas.

3.8 Análisis de perfiles de ribosomas

Los perfiles correspondientes a las subunidades ribosomales, monosomas y polisomas se determinaron mediante extracción de los mismos, seguido de su fraccionamiento mediante sedimentación diferencial en gradientes de sacarosa (Kawaguchi et al. 2004). Se extrajo el ARN de cada fracción resultante y los valores de concentración obtenidos se usaron para calcular la distribución ribosomal. La composición de cada fracción se determinó mediante la separación del ARN resultante en electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

3.8.1 Fraccionamiento de polisomas en gradientes de sacarosa

Alrededor de 1 ml de tejido congelado y triturado se mezcló con 1,2 ml de tampón de extracción (200 mM Tris-HCl pH=9, 200 mM KCl, 25 mM EGTA, 35 mM MgCl_2 , 0,8 % β -mercaptoetanol, 50 $\mu\text{g/ml}$ cicloheximida, 50 $\mu\text{g/ml}$ cloranfenicol, 500 $\mu\text{g/ml}$ heparina, 1 % Tritón X-100, 1 % Brij 35, 1 % Tween-40, 1 % NP40, 1% polioxietilén-10-trideciléter, 1% ácido deoxicólico) y se dejó en hielo 30 min, mezclando cuidadosamente cada 5 min por inversión suave de los tubos. Se centrifugó la mezcla a 10.000 g durante 10 min y se recogió el sobrenadante. La operación se repitió hasta que el sobrenadante quedó completamente libre de restos sólidos. Se separó 1 ml para cargar en los gradientes de sacarosa y el resto (unos 200 μl) se conservaron para la extracción de ARN total.

Las muestras se cargaron en la superficie de los gradientes de sacarosa (20-45% sacarosa en 40 mM Tris-HCl pH 8,4, 20 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , 50 $\mu\text{g/ml}$ cicloheximida, 50 $\mu\text{g/ml}$ cloranfenicol volumen total de 10 ml por gradiente) y se centrifugaron a 38.000 rpm (247.000

g máx), con aceleración 4 y sin freno en una centrífuga Optima L-100 XP (Beckman Coulter) y rotor SW41 por 3,5 h. Se recogieron fracciones de 500 µl desde el tope hasta el fondo del gradiente.

3.8.2 Extracción de ARN

Cada fracción procedente de los gradientes (junto con la alícuota separada del extracto total) fue sometida a extracción con 1 volumen de una mezcla fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1) y el ARN se precipitó de la fase acuosa mediante adición de 2,5 volúmenes de etanol y 0,1 volúmenes de NaOAc 3M pH= 4,5 e incubación durante la noche a -20 °C. Tras la obtención del precipitado mediante centrifugación a 13.000 g durante 30 min, se lavó con etanol 75% y se volvió a recoger mediante centrifugación a 13 000 g durante 10 min. Se dejó secar unos minutos y se disolvió en 25 µl de agua MilliQ por fracción y 100 µl en el caso de la muestra de ARN total.

3.9 Extracción de proteínas y SDS-PAGE

Las muestras de tejido vegetal fueron homogenizadas en tampón de extracción (4M urea, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 1mM DTT, 1mM PMSF; 1x cóctel inhibidor de proteasas (Roche)), y centrifugadas durante 10 min a 4°C y 13.000 g y se conservó el sobrenadante obtenidos como extracto de proteínas totales. La concentración de proteínas se determinó con el kit *Biorad protein assay* (Biorad) basado en el método de cuantificación de Bradford. De cada muestra se separaron 30 µg mediante SDS-PAGE utilizando el sistema *Mini-protean* (Biorad) y geles del 10 o 12,5 % dependiendo de la aplicación posterior.

3.10 Western blot

Las proteínas fueron transferidas mediante electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (GE HealthCare), que fueron teñidas con Rojo Ponceau para confirmar la transferencia. Para la detección de proteínas específicas por inmunomarcage (*western blot*), se bloquearon los sitios no ocupados de la membrana durante 1 h con leche en polvo al 5% en tampón TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5). Posteriormente se lavó tres veces durante 5 min en TBST y se incubó con el anticuerpo específico (α -eIF2 α , α -RPT5, α -PR1; en cada caso siguiendo las instrucciones del fabricante) durante la noche a 4 °C. Después de tres lavados de 10 min con TBST, la membrana se incubó con anticuerpo α -IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Agrisera) durante 1 h a temperatura ambiente.

Se retiró el anticuerpo, se volvió a lavar tres veces durante 10 min con TBST, se secó la membrana y se incubó con el reactivo revelador *SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Scientific) durante 3 min. El revelado de las bandas se realizó sobre películas fotosensibles (Konica Minolta) utilizando un equipo revelador SRX-101A (Konica Minolta).

3.11 Extracción y análisis de ácidos nucleicos

3.11.1 Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó a partir de 5 ml de cultivo bacteriano utilizando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep (Qiagen).

3.11.2 Extracción de ADN vegetal

La extracción de ADN vegetal se llevó a cabo por extracción con fenol-cloroformo según (Dellaporta et al. 1983).

3.11.3 Amplificación de fragmentos de ADN

La amplificación de fragmentos de ADN específicos se hizo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Perkin Elmer). Los oligos necesarios para la amplificación se adquirieron de Sigma-Aldrich.

3.11.4 Electroforesis de ADN

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) en tampón TBE 0,5 X (45 mM Tris Borato, 1 mM EDTA, pH 8) usando un transiluminador (BioRad).

3.11.5 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se realizó en SECUGEN y las secuencias fueron analizadas por el conjunto de programas Lasergene (DNASTAR)

3.11.6 Extracción de ARN de tejido vegetal

Salvo en los casos en que se analizaron los perfiles de polisomas, el ARN total de las muestras vegetales se extrajo según el método descrito por Logemann, Schell, and Willmitzer

(1987). El tejido vegetal fue homogenizado en tampón Z6 (8M Cloruro de guanidinio, 20 mM MES, 20 mM EDTA), y después de eliminar los restos de tejido mediante centrifugación, se extrajo el ARN con fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1). El ARN se precipitó a -20°C durante la noche añadiendo 0,05 volúmenes de HAc 1M y 0,7 volúmenes de etanol. Tras la obtención del precipitado mediante centrifugación a 13.000 g durante 10 min, se lavó primero con NaAc 3M pH 4,5 y luego con etanol 75%, obteniéndose en cada caso un precipitado que se recoge mediante centrifugación a 13.000 g durante 10 min. Se dejó secar unos minutos y se disolvió en 100 µl de agua MilliQ.

3.11.7 Electroforesis de ARN

La separación y visualización de las muestras de ARN se realizó mediante electroforesis desnaturalizante en geles de agarosa con formaldehído según se describe en Sambrook et al. (1989). En resumen, un máximo de 5 µg de ARN se desnaturalizó a 55 °C en presencia de formamida, formaldehído y bromuro de etidio y se resolvieron en gel de agarosa (1,5%) con 15 % de formaldehído y tampón MEN (Morfolino-propano sulfonato, acetato de sodio y EDTA). La electroforesis se realizó durante 2 h a 100 V en el propio tampón MEN.

3.11.8 Northern blot

El ARN resuelto por electroforesis se transfirió a una membrana de nylon (Hybond-N®, Amershan) mediante transferencia por capilaridad según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, los ácidos nucleicos fueron fijados a la membrana mediante irradiación con luz UV (700 mJ/cm²).

Las ribosondas específicas para la hibridación de los genes *PR1* (At2g14610), *CAT3* (At1g20620) y *ABR* (At3g02480) fueron preparadas por transcripción *in vitro* en presencia de α-[³²P]-CTP con el kit *RNA transcription kit* (Roche). La secuencia molde fue clonada en el vector pGEM®-T-Easy (Promega) de manera que queda flanqueada por las secuencias necesarias para la actividad de las ARN polimerasas (SP6 o T7) y su orientación fue determinada por secuenciación. El vector así construido fue linearizado con enzimas de restricción que cortaran por el borde 3' del inserto, y usado para la transcripción *in vitro* con la ARN polimerasa que reconocía la región flanqueante al extremo 5' (logrando de esta forma la transcripción sólo del inserto en lugar del plásmido completo).

3.11.9 Preparación de ADN complementario y PCR cuantitativa

La expresión de genes en las poblaciones de ARN total y polisómico se cuantificó mediante PCR cuantitativa a partir del ADN complementario (ADNc) correspondiente a cada muestra.

Como paso previo, se limpiaron todas las muestras de ARN usando el kit *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche). A partir de aquí, se preparó el ADNc correspondiente a un máximo de 1 µg de ARN usando el kit *Transcription First Stand cDNA Synthesis Kit* (Roche) y se cuantificaron mensajeros específicos usando el kit *FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) system* (Roche) en un termociclador *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Los resultados fueron procesados mediante el programa *7500 Software v2.0.5* (Applied Biosystems). Como control se usó en todos los casos la expresión del gen 18S que codifica el ARN estructural de la subunidad pequeña del ribosoma citoplasmático. Los genes analizados y cebadores utilizados a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados como cebadores en este estudio

| Oligo 1 (directo) | Oligo 2 (reverso) | Gen diana | Amplicón (pb) |
|-----------------------|-------------------------|----------------------------|---------------|
| GTCTTAATTGGCCGGGTCGTG | CGAAGGCCAACACAATAGGATCG | <i>18S</i> (At3g41768) | 133 |
| GTTCAACAACGAGGCACGAGG | CAAGTCACCGCTACCCAG | <i>PR1</i> (At2g14610) | 165 |
| AGGCCGACAAGTGGGTTCAA | CCGCGTTCTCGATGTTCTGC | <i>PR2</i> (At3g57260) | 138 |
| CGTGTTTCATACAAGCGGCAT | GAGCTTGGGTCTTGACCG | <i>PR5</i> (At1g75040) | 109 |
| ACTCCAGCTGTTTGTGGGCT | GCTACTATCCCTGTCCCCGC | <i>ICS1</i> (At1g74710) | 197 |
| CTGCAGGGATCCACGAGACA | CTCGGGGCAAGAGCTGTGAT | <i>ACT8</i> (At1g49240) | 157 |
| CCGATCACTCCAAGCTTGTCT | GAGCCGGAGAGGCAACCATA | <i>RBCS1-A</i> (At1g67090) | 148 |

3.12 Análisis bioinformático

3.12.1 Análisis de variabilidad de proteínas ribosomales

El análisis comparativo de la variabilidad de secuencias dentro de las familias de proteínas ribosomales de *A. Thaliana* se realizó identificando en primer lugar dichas familias así como las correspondientes en *Homo sapiens* y *Saccharomyces cerevisiae*, utilizadas como referencia en la comparación. Para ello, nos basamos en trabajos donde se identificaban todos los genes de proteínas ribosomales de los tres organismos (Barakat et al. 2001; Yoshihama et al. 2002; <http://ribosome.med.miyazaki-u.ac.jp/>).

Dentro de cada familia se obtuvieron (<http://www.uniprot.org/>) y alinearon las secuencias aminoacídicas (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Para las familias de más de un miembro, se calculó la identidad promedio de cada familia:

$$Id = \frac{\sum(I_{ij})}{\sum(n-1)}$$

donde I_{ij} es el porcentaje de identidad entre las proteínas i y j , mientras n es el número de miembros de la familia. A partir de aquí se definió la variabilidad como $\log_2(100 - Id)$

3.12.2 Análisis de variabilidad de expresión de genes de proteínas ribosomales

Para analizar los perfiles de expresión de los genes de proteínas ribosomales durante la respuesta de defensa, utilizamos los datos depositados en la base de datos de expresión génica Genevestigator (<https://genevestigator.com>). De aquí, extrajimos los datos de expresión diferencial de todos los experimentos relacionados con la defensa (229 en total) para cada uno de los genes de las familias de proteínas ribosomales de *A. thaliana*.

Para cada familia de genes se definieron dos valores de variabilidad de expresión: Variabilidad absoluta y variabilidad relativa.

La variabilidad absoluta de cada familia se definió como una medida de cuán diferentes son, de media, las expresiones de los genes que la conforman respecto a un gen hipotético que no cambia su expresión.

Como medida de distancia entre los perfiles de expresión se utilizó la distancia euclidiana, definida como

$$d(E_a, E_b)_k = \sqrt{(e_a - e_b)_1^2 + (e_a - e_b)_2^2 + \dots + (e_a - e_b)_k^2} = \sqrt{\sum_1^k (e_a - e_b)^2}$$

Donde $d(E_a, E_b)$ es la distancia entre los patrones de expresión del gen A (E_a) y el gen B (E_b), calculada a partir de los valores de expresión diferencial logarítmica de cada gen (e_a y e_b) en cada una de las k comparaciones experimentales seleccionadas.

A partir de esta distancia, se puede definir el grado de variabilidad de expresión de cada familia de genes como la distancia promedio entre los patrones de expresión de cada uno de

sus genes miembros (i) y un gen hipotético ($const$) que no cambie su expresión. Llamémosle variabilidad inicial:

$$V_0 = \frac{\sum d(E_i, E_{const})_k}{n} = \frac{\sum \sqrt{\sum_1^k (e_i - 0)^2}}{n} = \frac{\sum \sqrt{\sum_1^k e_i^2}}{n}$$

Donde n es el número de genes de la familia y e_i es la expresión diferencial del gen i en cada una de las k comparaciones experimentales.

Análogamente podemos definir además el grado de variabilidad medio entre los patrones de expresión de los genes de la misma familia. Llamémosle variabilidad interna:

$$V_{int} = \frac{\sum_{ij} \sqrt{\sum_1^k (e_i - e_j)^2}}{\sum (n - 1)}$$

donde k es el número de condiciones, e_i, e_j son las expresiones diferenciales de los genes i, j en cada comparación experimental, y n es el número de genes de la familia.

Así, para cada familia, la diferencia $V_{int} - V_0$ es, por tanto, una medida de si sus genes miembros tienden, ante el grupo de condiciones k , a tener perfiles de expresión similares ($V_{int} - V_0 < 0$) o divergentes ($V_{int} - V_0 > 0$).

3.12.3 Correlación entre la variabilidad de secuencia y expresión dentro de las familias de proteínas ribosomales

La relación entre las variabilidades de secuencia ($\log_2(100 - Id)$) y expresión ($V_{int} - V_0$) se analizó calculando el coeficiente de correlación de Pearson entre ambas variables mediante el programa SPSS® (IBM).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Participación de NOXY7 en la regulación de la síntesis de proteínas

Estudios previos realizados en el laboratorio permitieron identificar una colección de plantas mutantes, insensibles a la acción de las oxilipinas 9-HOT y 9-KOT, producidas a través de la ruta de síntesis iniciada por la acción de los enzimas 9-LOXs. Dentro de los mutantes seleccionados, en el presente trabajo nos hemos centrado en la caracterización de *noxy7* que, de acuerdo a resultados anteriores, se encuentra afectado en la activación de las defensas apoplástica y estomática, en la deposición de callosa y en la respuesta de estrés oxidativo. La mutación *noxy7* fue localizada en el nucleótido que ocupa la última posición del intrón 21 del locus At1g64790. Esta mutación provoca la retención de dicho intrón en el transcrito *noxy7*, que se traduce en una proteína que conserva el marco de lectura original, pero que posee una inserción de 26 aminoácidos en la posición 1043 de la proteína (Kulasekaran 2012) (Fig. 1; ver Introducción). El mutante *noxy7* comparte características fenotípicas con otros alelos descritos previamente, tales como *ila1*, *ila2*, *ila3*, *atgcn1-1* y *atgcn1-2*, en los que destaca el amarilleamiento de las hojas emergentes y el tamaño ligeramente menor que el correspondiente al de las plantas silvestres (Monaghan & Li 2010; Wang et al. 2016).

4.1.1 La proteína NOXY7 participa en la fosforilación del factor de iniciación eIF2 α

El locus At1g64790 presenta un 33% de identidad y un 54% de similitud con el gen *GCN1* de levaduras. Numerosos estudios en levaduras han puesto de manifiesto que la proteína GCN1 forma parte del complejo GCN1-GCN2-GCN20, implicado en la regulación de la síntesis de proteínas en respuesta a condiciones de estrés nutricional y ambiental. Dicha regulación se ejerce mediante la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α por la quinasa GCN2 (Fig. 2; ver Introducción) (Sattlegger & Hinnebusch 2000; Castilho et al. 2014; Kubota et al. 2000; Marton et al. 1993). La identificación de la mutación *noxy7* en un gen de *Arabidopsis* homólogo al regulador traduccional GCN1 de levaduras, ponía de manifiesto la existencia de un complejo análogo en plantas, cuya función en la regulación de la traducción estaría afectada en el mutante *noxy7* que sería, además, deficiente en la señalización de las oxilipinas y en la activación de la respuesta de defensa de la planta.

Para examinar la funcionalidad de la proteína NOXY7 de *Arabidopsis*, procedimos a estudiar si la mutación *noxy7* afectaba a la fosforilación del factor eIF2 α durante la respuesta de la planta a condiciones de estrés similares a las descritas en otros organismos tales como levaduras, mamíferos, etc. Los tratamientos de estrés examinados en este trabajo han sido: la

reducción de los niveles de aminoácidos, la alteración de la función mitocondrial, la acumulación de proteínas con patrones de plegamiento defectuoso en el retículo endoplásmico y la inhibición de la traducción. Para simular estas condiciones procedimos a emplear plántulas silvestres y mutantes crecidas en medio MS, e incubadas en medio líquido conteniendo los compuestos de interés, aplicados a las concentraciones seleccionadas. En concreto, se emplearon los inhibidores de síntesis de aminoácidos clorosulfurón (CHL; inhibidor de la síntesis de isoleucina, leucina y valina) y fosfinotricina (PPT; inhibidor de la síntesis de glutamina), el inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial antimicina A (AA), el ditiotreitól (DTT) que inhibe la formación de puentes disulfuro generando un estrés derivado del plegamiento defectuoso de las proteínas, y el ácido bórico a altas concentraciones que afecta al metabolismo de aminoácidos y a la traducción en levaduras. La respuesta de las plantas silvestres se comparó con la de los mutantes *noxy7*, su alelo *ila3*, *gcn2* y *gcn20*. Los resultados de estos análisis pusieron de manifiesto que, en plántulas silvestres, todos los tratamientos examinados inducen la fosforilación del factor eIF2 α entre 1h y 3h después del tratamiento (Fig. 3), y que esta respuesta no se activa en los mutantes *gcn2*, *noxy7* e *ila3* en los que no se detectó la presencia de la forma fosforilada de factor eIF2 α . El defecto de los mutantes *noxy7*, *ila3* y *gcn2* revela el requerimiento de las proteínas correspondientes durante

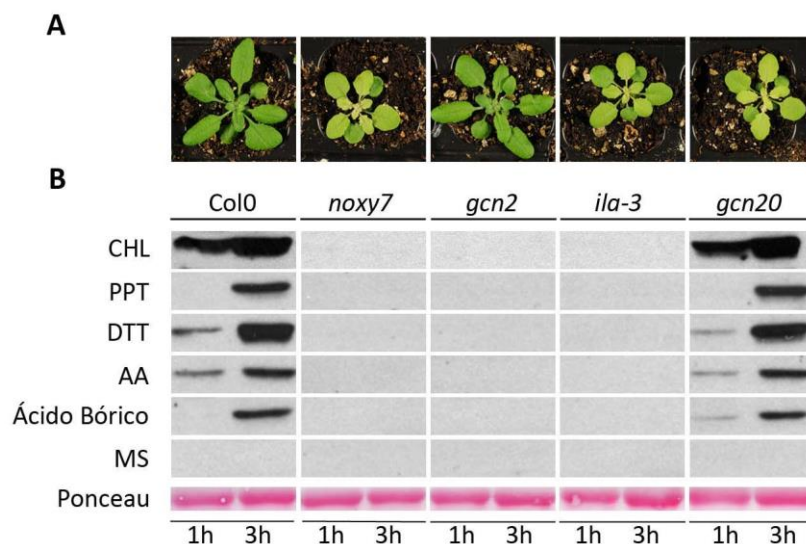


Figura 3. Fenotipo y detección de eIF2 α -P en plantas silvestres (Col-0) y mutantes *noxy7*, *gcn2*, *ila-3* y *gcn20*. (A) Fenotipos de plantas de cuatro semanas crecidas en tierra. (B) Fosforilación de eIF2 α en plántulas de 7 días tratadas durante 1h y 3h con clorosulfurón (CHL), fosfinotricina (PPT), ditiotreitól (DTT), antimicina A (AA), ácido bórico o control (MS). La presencia de eIF2 α -P se detectó en geles de proteínas transferidos a membranas de nitrocelulosa e hibridados con un anticuerpo comercial anti eIF2 α -P (Cell Signaling). La tinción con rojo Ponceau se utiliza como control de carga.

la activación de este proceso, y sugiere la conservación funcional del sistema de regulación GCN1-GCN2 en la fosforilación de eIF2 α en plantas de *Arabidopsis*. Los resultados obtenidos con el mutante *gcn20* permiten comprobar que, a diferencia de lo observado en *noxy7* y *gcn2*, la mutación *gcn20* no impide la fosforilación del factor eIF2 α cuya acumulación alcanza niveles similares a los detectados en las plántulas silvestres (Fig. 3). Estos resultados ponen de manifiesto una diferencia importante entre las plantas y las levaduras en las que la actividad GCN20 es necesaria para llevar a cabo la fosforilación de eIF2 α .

4.1.2 La fosforilación del factor eIF2 α no provoca una inhibición global de la síntesis de proteínas en *Arabidopsis*

Se ha demostrado que la fosforilación del factor eIF2 α en levaduras y en mamíferos inhibe el reciclaje GDP/GTP en el complejo ternario eIF2-ARnt(Met)_i-GTP necesario para iniciar la síntesis de proteínas. Este defecto provoca una importante disminución en la tasa de síntesis de proteínas, que puede visualizarse mediante ensayos de incorporación de aminoácidos (Met/Cys) marcados con el radioisótopo ³⁵S, seguidos de la extracción de proteínas, de su resolución en geles de acrilamida y de su exposición mediante autorradiografía, para detectar las proteínas sintetizadas *de novo* durante el tiempo del tratamiento. La activación de este proceso se ve afectada en diversas circunstancias tales como la mutación del residuo Ser-51 de eIF2 α en el que ocurre la fosforilación, o la pérdida de la actividad de la quinasa GCN2, en cuyo caso la inhibición de la síntesis *de novo* de proteínas es sensiblemente inferior. En plantas se ha descrito un único estudio en el que el tratamiento con el inhibidor de la síntesis de purinas 8-azaadenina (azA) induce la fosforilación de eIF2 α y la inhibición de la síntesis de proteínas, y en el que esta respuesta disminuye en el mutante *gcn2* (Lageix et al. 2008), por lo que a diferencia de lo que ocurre en otros organismos, el número de trabajos en los que se ha estudiado la relación entre la fosforilación del factor eIF2 α y la tasa de síntesis de proteínas en plantas es escaso por el momento. De hecho, se han publicado resultados contradictorios acerca del papel de la fosforilación del factor eIF2 α en la adaptación de las plantas a estrés (Zhang et al. 2008; Faus et al. 2015). Por estas razones, hemos procedido a evaluar si la fosforilación del factor eIF2 α , mediada por las proteínas NOXY7 y GCN2, provoca la inhibición de la síntesis de proteínas y facilita la adaptación de las plantas a distintos tipos de estrés. A este objeto, hemos procedido a examinar el fenotipo de plantas silvestres y mutantes en respuesta a estrés así como la síntesis *de novo* de proteínas durante la respuesta de las plantas a los tratamientos examinados.

De acuerdo a lo esperado, la germinación de semillas en presencia de clorosulfuron (CHL), fosfinotricina (PPT), DTT, antimicina A (AA) o ácido bórico produjo una disminución del crecimiento en los tres genotipos examinados: plántulas silvestres, *noxy7* y *gcn2* (Fig. 4A-G). La presencia de DTT en el medio de cultivo produce una disminución del tamaño de las plántulas aunque el efecto observado es similar en los tres genotipos examinados (Fig. 4D). Por otro lado, los inhibidores de la síntesis de aminoácidos afectaron de forma diferencial a las plántulas *noxy7* y *gcn2*, respecto a las silvestres. Así, los dos mutantes mostraron un aumento de susceptibilidad a la presencia de CHL, en comparación al efecto observado en el genotipo

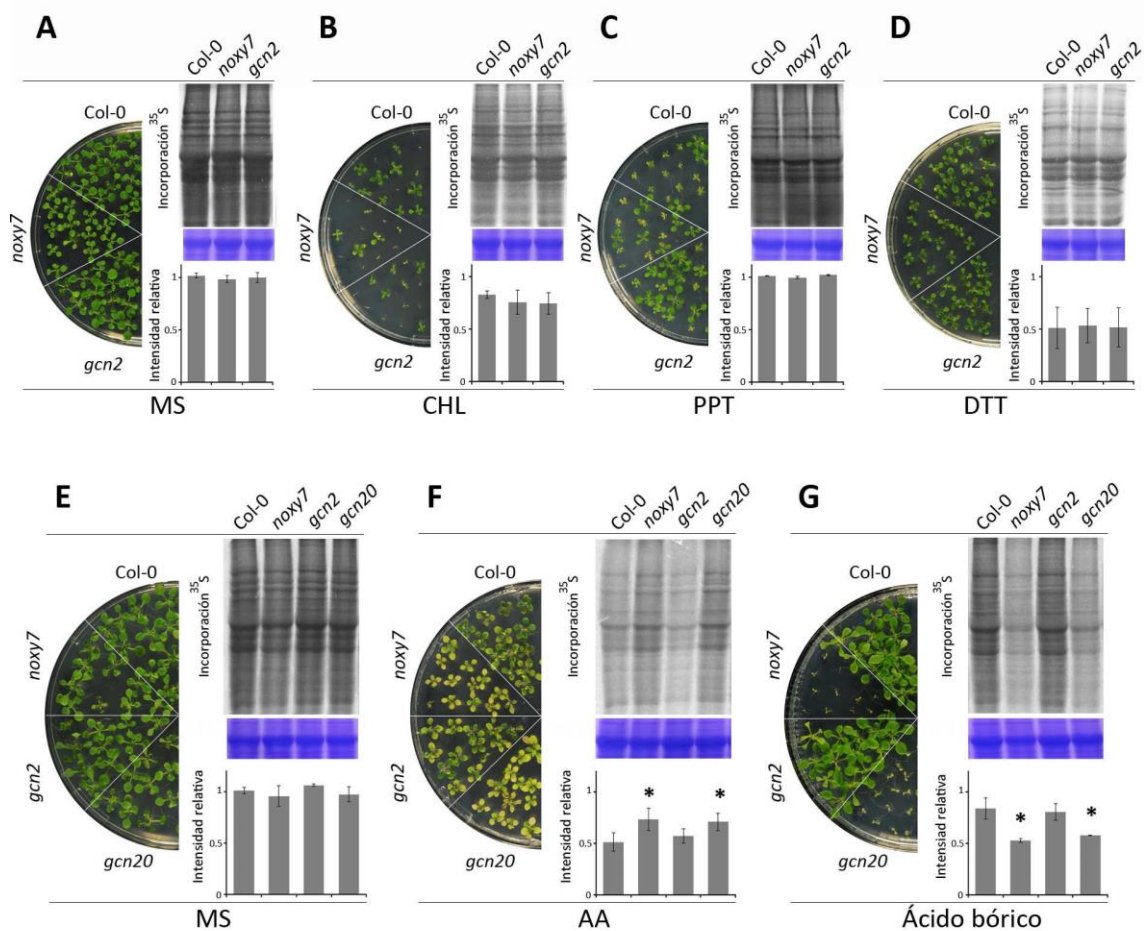


Figura 4. Relación entre la adaptación a tratamientos de estrés inductores de la formación de $\text{eIF}2\alpha\text{-P}$ y la tasa de síntesis de proteína. Se muestran los fenotipos y los niveles de incorporación de ³⁵S (cuantificación y foto representativa) de plántulas silvestres (Col-0), *noxy7* y *gcn2* en respuesta a tratamientos con: **(A)** MS control, **(B)** clorosulfurón (CHL), **(C)** fosfinotricina (PPT) y **(D)** ditiotretitol (DTT). Los mismos parámetros se evaluaron incluyendo además plántulas de *gcn20* en respuesta a: **(E)** MS control, **(F)** antimicina A (AA) y **(G)** ácido bórico. En los ensayos de incorporación de ³⁵S se realiza una tinción con azul Coomassie. Las cantidades relativas de proteína marcada fueron estimadas a partir de tres réplicas independientes. Los asteriscos encima de las barras indican diferencias significativas respecto a las plántulas silvestres (t de Student, $p < 0,05$) en cada una de las condiciones examinadas.

silvestre (Figs. 4B y 5A), mientras que por el contrario, ambos mutantes, *noxy7* y *gcn2*, resultaron más resistentes a la presencia de PPT (Figs. 4C, 5B).

El análisis de la respuestas a antimicina A y a ácido bórico no reveló diferencias significativas entre *gcn2* y las plántulas silvestres, mientras que el mutante *noxy7* mostró mayor susceptibilidad con aparición de un amarilleamiento foliar, más pronunciado que el producido en *gcn2* y en las plantas silvestres, durante la respuesta a antimicina A (Fig. 4F), y una inhibición drástica del crecimiento en el tratamiento con ácido bórico (Fig. 4G). Este último fenotipo es especialmente relevante ya que a esta concentración de ácido bórico (1 mM) no se aprecian cambios visibles en las plántulas silvestres o en *gcn2* en comparación al fenotipo observado en condiciones control de crecimiento. De hecho, la determinación del peso fresco (Fig. 6) revela que a concentraciones más bajas de ácido bórico (250 μ M, cercanas a las presentes en el medio de cultivo) el mutante *noxy7* sufre una reducción de peso cercana al 50%, mientras que las plántulas silvestres y el mutante *gcn2* permanecen prácticamente inalteradas. Paralelamente a estos ensayos, procedimos a examinar la síntesis de proteínas *de novo* evaluando la incorporación de Met/Cys marcadas con 35 S en las mismas condiciones experimentales que las descritas anteriormente para la evaluación de la fosforilación del factor eIF2 α (Fig. 4A-G). Los resultados de estos análisis permitieron observar que, el tratamiento de plántulas silvestres con CHL, DTT, antimicina A y ácido bórico provoca una disminución en la incorporación del marcaje, y por tanto, de la síntesis de proteínas, mientras que la presencia de PPT no produjo ningún cambio aparente. El análisis del mutante *gcn2* no permitió detectar diferencias significativas en la tasa de síntesis de proteínas con respecto a las observadas en las plantas silvestres. De la misma manera, la inhibición de la síntesis de proteínas observada

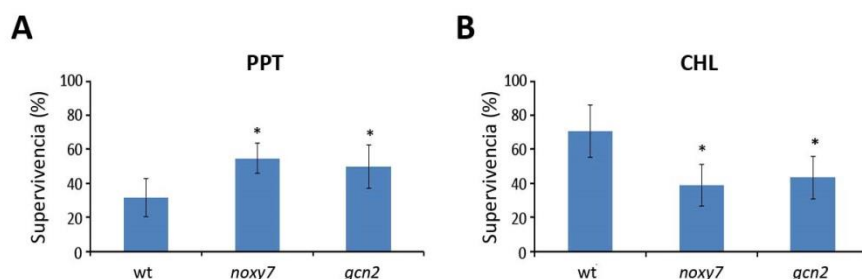


Figura 5. Evaluación de la supervivencia de plántulas silvestres (Col-0), *noxy7* y *gcn2*, crecidas en presencia de **(A)** fosfotriester (PPT) y **(B)** clorosulfurón (CHL). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a plántulas silvestres (t de Student, $p < 0,05$) en cada condición.

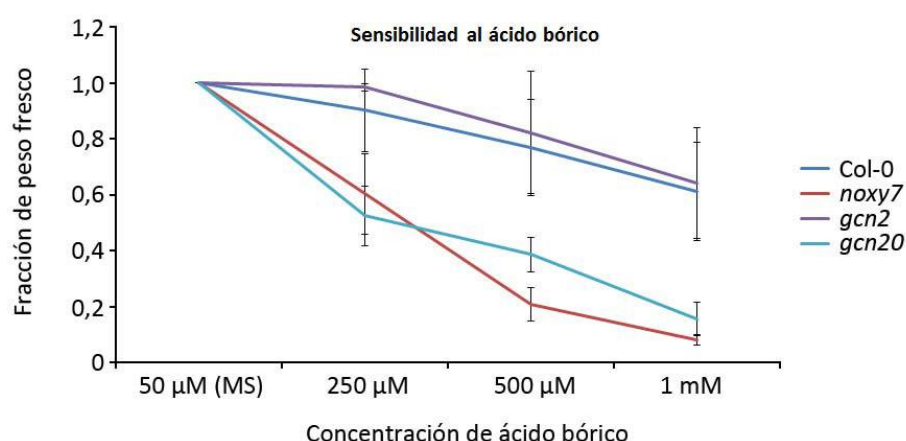


Figura 6. Efecto del ácido bórico sobre el crecimiento de plántulas silvestres (Col-0), *noxy7*, *gcn2* y *gcn20*. Se muestra el peso fresco relativo determinado en plántulas de dos semanas crecidas en medio MS horizontal (con una concentración de 50 µM de ácido bórico), y en medio MS suplementado con concentraciones crecientes de boro. Las barras representan la desviación estándar de los valores determinados en cada una de las concentraciones examinadas.

en la respuesta a DTT y CHL del mutante *noxy7* era similar a la correspondiente a *gcn2* y a las plántulas silvestres. A diferencia de los resultados correspondientes al mutante *gcn2*, la respuesta inhibitoria de la antimicina A en *noxy7* se vio significativamente atenuada, mientras que, por el contrario, la aplicación de ácido bórico acentuó la inhibición de síntesis de proteínas, con respecto a la observada en *gcn2* y en el genotipo silvestre (Fig. 4F, G).

El hecho de que la fosforilación del factor eIF2α inducida en respuesta a PPT, no esté acompañada de una inhibición de la síntesis de proteínas indica que estos dos procesos no están necesariamente ligados en *Arabidopsis*. Además, el hecho de que en los tratamientos en los que se detectó una reducción en la incorporación de marcaje (CHL, DTT, antimicina A, ácido bórico), no se produzcan diferencias significativas entre las plántulas silvestres y el mutante *gcn2*, indicaba que la inhibición de la traducción observada no está ligada ni a GCN2 ni al factor eIF2α, sino que estaría regulada a través de un mecanismo independiente.

4.1.3 NOXY7 y GCN20 regulan la síntesis de proteínas independientemente de GCN2 y eIF2α-P

El mutante *gcn2* no presenta alteraciones fenotípicas aparentes respecto a las plantas silvestres, mientras que por el contrario, los mutantes *noxy7* y *gcn20* difieren de estas

presentando alteraciones fenotípicas similares que podrían indicar la participación de las proteínas NOXY7 y GCN20 en procesos comunes (Fig. 3A). Para analizar esta coincidencia, procedimos a examinar la respuesta del mutante *gcn20* a la presencia de antimicina A y de ácido bórico, los dos tratamientos en los que la respuesta del mutante *noxy7* varía significativamente de la observada en las plantas silvestres y en el mutante *gcn2*.

Los resultados de estos análisis permiten observar que las plantas *gcn20* responden igual que el mutante *noxy7* a la presencia de antimicina A y boro, tanto en las alteraciones fenotípicas provocadas por ambos tratamientos, como en los niveles de síntesis *de novo* de proteínas detectados (Fig. 4F, G). Estos resultados ponen de manifiesto la participación de ambas proteínas en los procesos examinados en los que actuarían de forma coordinada, posiblemente en la regulación de la traducción durante la adaptación a estos dos tipos de estrés. Además, el hecho de que el mutante *gcn20* conserve intacta su capacidad para activar la fosforilación de eIF2 α (Fig. 3B) apoya la idea de que los genes *NOX76* y *GCN20* hayan divergido funcionalmente hacia una ruta de regulación de la traducción independiente de *GCN2*.

4.2 NOXY7 y GCN20 señalizan la acción de las oxilipinas independientemente de GCN2

Los resultados descritos ponen de manifiesto que proteína NOXY7 provoca la activación de la quinasa GCN2 y de la fosforilación del factor eIF2a en respuesta a la inhibición de la síntesis de amino ácidos, mientras que actúa de forma coordinada con GCN20 durante la respuesta a antimicina A y al boro, en procesos de adaptación independientes de GCN2 y de la formación de eIF2 α -P.

Dado que el mutante *noxy7* fue aislado en un escrutinio genético dirigido a identificar plantas mutantes insensible a la presencia de 9-HOT, procedimos a examinar si la acción de la proteína NOXY7 en la respuesta a oxilipinas requería la participación de las proteínas GCN2 y/o GCN20. Para responder a esta pregunta procedimos a examinar la respuesta a la presencia de oxilipinas de los mutantes *noxy7*, *gcn2* y *gcn20*, examinando para ello, la posible capacidad de estos compuestos para activar la fosforilación del factor eIF2 α y el fenotipo de rizo radicular que se activa en respuesta a estos compuestos. En estos estudios, además de las oxilipinas 9-HOT y 9-KOT, examinamos también la respuesta a otras oxilipinas que regulan procesos de desarrollo y de defensa a través de rutas de señalización independientes a la que se activan por la acción de 9-HOT y 9-KOT. En concreto se examinó la respuesta a la aplicación de OPDA y JA, producidas por la ruta de síntesis que se inicia por la acción de las 13-LOX, y al ácido 9-oxo-

nonanoico, 9-Oxo, producida de forma no enzimática. En estos experimentos pudimos observar que los tratamientos con las oxilipinas 9-HOT, 9-KOT y 9-Oxo, no producen la fosforilación del factor eIF2 α , mientras que la aplicación de OPDA y JA producen de forma reproducible la acumulación niveles moderados de eIF2 α -P (Fig. 7A).

Por otro lado, el crecimiento de las plantas caracterizadas en presencia de oxilipinas permitió observar la insensibilidad de los mutantes *noxy7* y *gcn20* a la aplicación de 9-HOT, tanto en la formación de rizo radicular, como en la acumulación de los depósitos de calosa que acompaña al tratamiento con 9-HOT, mientras que por el contrario el mutante *gcn2* responde de forma similar a las plántulas silvestres, activando un fenotipo de rizo radicular y la acumulación de depósitos de callosa (Fig. 7B). La presencia de JA, OPDA o 9-Oxo en el medio de crecimiento produce una disminución en el tamaño de la raíz de plántulas. La evaluación de este fenotipo no reveló diferencias significativas en la respuesta de a JA y OPDA de los mutantes examinados en relación a las plantas control, mientras que en el caso del ácido 9-oxo-nonanoico la reducción de crecimiento observada era significativamente menor en *noxy7* y *gcn20* que en *gcn2* y en plantas silvestres (Fig. 7C). Estos resultados indican la participación coordinada de NOXY7 y GCN20 en la señalización de las respuestas a 9-HOT, 9-KOT y 9-Oxo, y que este proceso es independiente de GCN2 y eIF2 α -P.

4.3 NOXY7, pero no GCN2 ni eIF2 α -P controlan la respuesta de defensa a *Pseudomonas*

Resultados del laboratorio anteriores a este estudio habían puesto de manifiesto que la mutación *noxy7* interfiere con la activación de la respuesta de defensa frente a la infección de la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* pav tomato. Además, la inoculación de distintas cepas bacterianas demostró que el defecto del mutante *noxy7* afecta tanto a la activación de la defensa post-invasiva (apoplástica), como a la defensa pre-invasiva (estomática). Para profundizar en este estudio, nos propusimos examinar si la participación de la proteína NOXY7 en la inmunidad vegetal estaba asociada, o no, a la activación de la proteína GCN2 y de la fosforilación del factor eIF2 α . A este objeto procedimos a inocular los mutantes *noxy7*, *gcn2*, y las plantas silvestres con distintas cepas bacterianas y a comparar el efecto de dicha inoculación en la planta mediante la evaluación del crecimiento bacteriano y la formación de síntomas. Para evaluar la inmunidad estomática de los genotipos de interés se inocularon, mediante aspersión sobre la superficie de la hoja, suspensiones bacterianas de la bacteria virulenta *Pst* DC3000 o de la cepa atenuada *Pst* DC3000 AK87. Esta última es defectiva

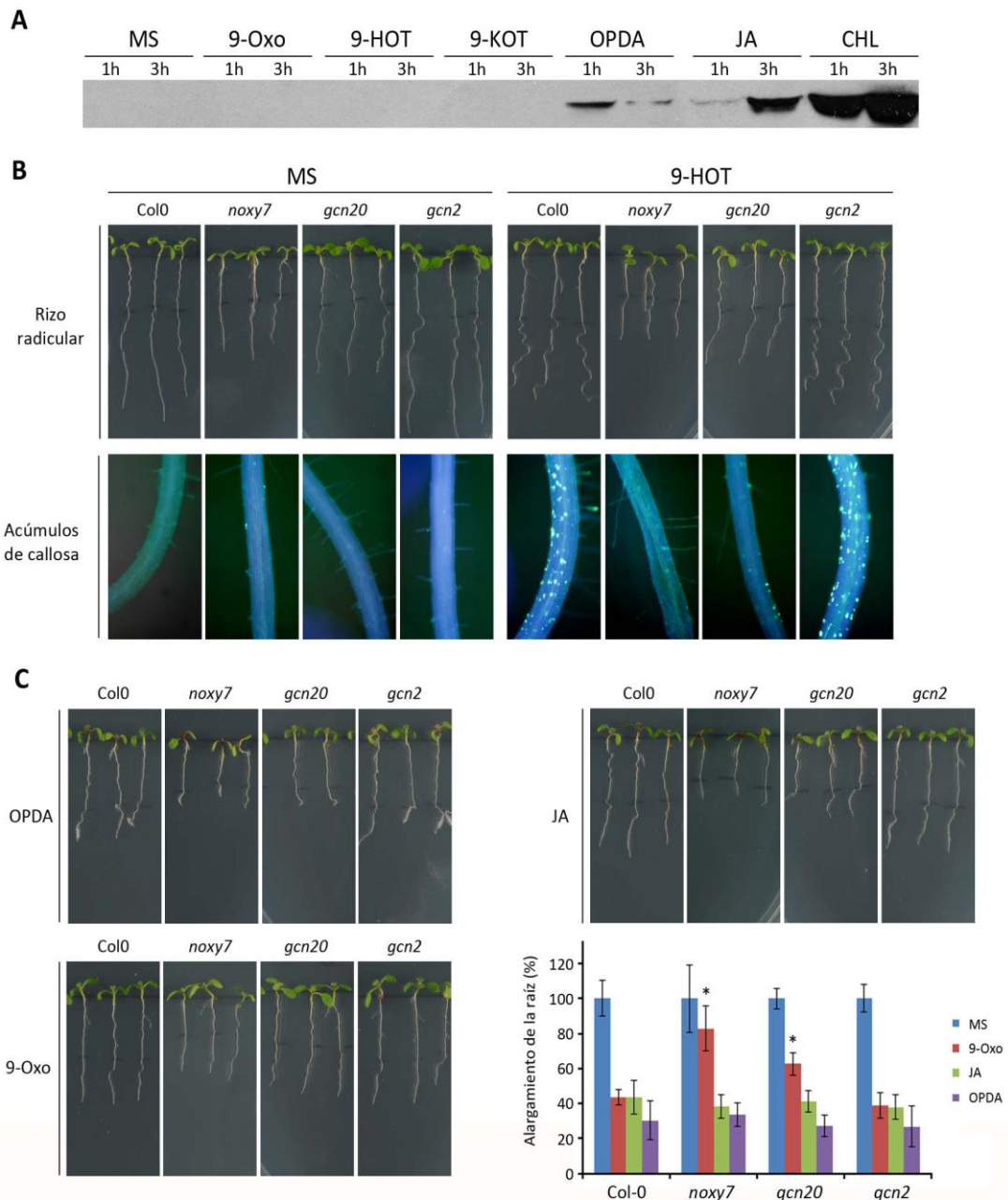


Figura 7. Análisis de la respuestas a oxilipinas de plántulas silvestres (Col-0) y mutantes *noxy7*, *gcn2* y *gcn20*. (A) Fosforilación del factor eIF2 α en plántulas silvestres tratadas durante 1 y 3 horas con 9-Oxo, 9-HOT, 9-KOT, OPDA y JA. Se examinó la respuesta a clorosulfurón como control positivo de la formación de eIF2 α -P. (B) Fenotipo radicular y acumulación de callosa en respuesta a la presencia de 9-HOT. (C) Fenotipo radicular y cuantificación del crecimiento radicular en presencia de 9-Oxo, OPDA y JA (foto característica y cuantificación). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a las plántulas silvestres (t de Student, $p < 0,05$) en cada una de las condiciones examinadas.

en la producción de la toxina coronatina utilizada por la bacteria para reabrir los estomas con objeto de facilitar la colonización tras el cierre inicial de estas estructuras celulares en respuesta a la presencia bacteriana.

En el caso de la defensa apoplástica se procedió a inocular con jeringuilla ambas cepas bacterianas y se examinó, igualmente, la respuesta a la cepa avirulenta *Pst* DC3000 *avrRpm1*. En todos los casos se evaluó el crecimiento bacteriano después de tres días de infección. Los resultados de estos análisis pusieron de manifiesto que la respuesta a la infección de las plantas *gcn2* y silvestres no muestran diferencias significativas, ni en la tasa de crecimiento bacteriano, ni en la formación de síntomas que se observan tras la inoculación de las cepas bacterianas examinadas (Figs 8A, B, C). La ausencia de diferencias entre *gcn2* y las plantas silvestres ocurre tanto a nivel de la defensa estomática, como de la apoplástica, y revela que la proteína GCN2 no participa en ninguno de los dos niveles de defensa examinados. De acuerdo

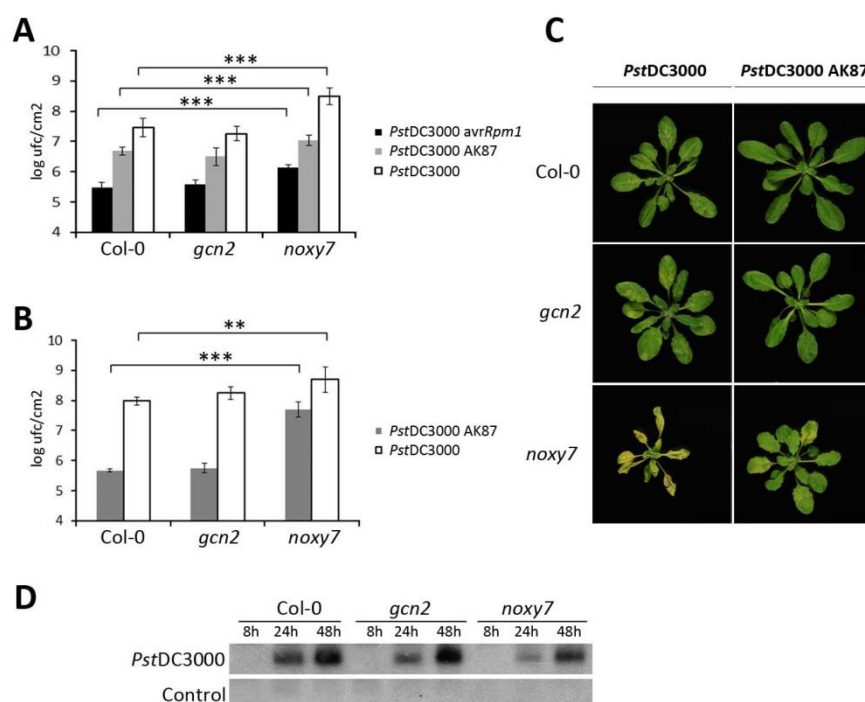


Figura 8. Análisis de la respuesta de plantas silvestres (Col-0), *noxy7* y *gcn2* a la infección de *Pseudomonas syringae*. (A) Nivel de crecimiento bacteriano tras la inoculación, en el apoplasto de las hojas, de suspensiones bacterianas de las cepas *Pst*DC3000 (virulenta), *Pst*DC3000 *avrRpm1* (avirulenta) y *Pst*DC3000 AK87 (deficiente en coronatina). (B) Nivel de crecimiento bacteriano en respuesta a la inoculación por aspersión de las cepas *Pst*DC3000 y *Pst*DC3000 AK87. (C) Visualización de los síntomas producidos tras la inoculación por aspersión de las cepas *Pst*DC3000 y *Pst*DC3000 AK87. (D) Evaluación del nivel de transcritos derivados del gen *PR1* en respuesta a la infiltración de *Pst*DC3000 en plantas Col-0, *noxy7* y *gcn2*. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a plántulas silvestres (t de Student; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$) en cada condición.

a estos resultados, el análisis del gen marcador *PR1* revela que la acumulación de transcritos alcanza niveles similares en *gcn2* que en plantas silvestres (Fig. 8D). El análisis de la respuesta apoplástica en las plantas *noxy7* muestra un aumento de la susceptibilidad con respecto a las plantas silvestres para las tres cepas examinadas. Las bacterias inoculadas alcanzan un nivel de crecimiento que oscila entre 4 a 10 veces (según la cepa utilizada) el nivel alcanzado en las plantas silvestres (Fig. 8A). Además, los niveles de acumulación del marcador *PR1* fueron en todos los casos inferiores a los observados en las plantas control (Fig. 8D). Estos resultados ponen de manifiesto que la mutación *noxy7* interfiere con la activación de la defensa apoplástica.

De la misma manera, los resultados obtenidos mediante la inoculación por aspersión, que permite la entrada de las bacterias a través de los estomas de la epidermis en los espacios intercelulares, revelaron que las plantas *noxy7* eran más susceptibles a la bacteria *Pst* DC3000 (Figs. 8B, C). La diferencia del crecimiento bacteriano en este caso (unas 5 veces más) fue de un orden similar a la registrada en las infecciones realizadas por infiltración (unas 10 veces más) confirmando el defecto en la activación de la inmunidad apoplástica del mutante. Al analizar la infección por aspersión con la cepa deficiente en coronatina *Pst* DC3000 AK87, el incremento de crecimiento en el mutante *noxy7* fue mucho mayor (unas 100 veces más) que en las plantas silvestres, confirmando el defecto adicional en el cierre de los estomas del mutante *noxy7* en respuesta a la percepción de la bacteria (Figs. 8B, C).

La hipersusceptibilidad del mutante *noxy7* concuerda con resultados anteriores en los que se describe la susceptibilidad del alelo *ila-3* frente a la infección de *Pseudomonas* (Monaghan & Li 2010). Por el contrario, los resultados que indican que la proteína GCN2 no juega un papel en esta respuesta contrastan con los publicados en trabajos anteriores en los que se describe que la inoculación de la bacteria *Pseudomonas maculicola* ES4326/avrRpt2, así como el tratamiento con SA, la hormona vegetal que regula la inducción de la defensa de la planta frente a esta bacteria, inducen la fosforilación de eIF2 α (Lageix et al. 2008; Pajerowska-Mukhtar et al. 2012) y que sugerían, por tanto, que este proceso pudiera formar parte de la respuesta inmune vegetal frente a patógenos biotrofos. Por ello, procedimos a examinar la posible formación de eIF2 α -P en respuesta al tratamiento con SA, así como a la inoculación de diversas cepas de *Pseudomonas*. Como se muestra en la Fig. 9, en los tratamientos ensayados se observó una fuerte inducción en los niveles de la proteína PR1, utilizada como marcador de la activación de la respuesta de inmunidad en la planta, sin embargo, en ninguno de estos tratamientos se pudo detectar la acumulación de factor eIF2 α fosforilado, confirmando que el

sistema GCN2/eIF2 α -P es prescindible en la defensa frente a *Pseudomonas* y que NOXY7 controla la defensa de manera independiente a GCN2.

Resultados anteriores del laboratorio demostraron que el mutante *noxy7* está afectado en el cierre de estomas inducido por patógenos, lo que coincide con el defecto descrito para el mutante *gcn20* en este proceso (Zeng et al. 2011). En este estudio y con objeto de analizar el paralelismo entre los mutantes *noxy7* y *gcn20* procedimos a examinar si como ocurre en el mutante *noxy7* el mutante *gcn20* se encuentra también afectado en la activación de la defensa apoplástica. A este objeto procedimos a examinar el nivel de colonización de la bacteria *P. syringae* a nivel de apoplasto (*PstDC3000*) en plantas *gcn20*. Los resultados de estos análisis pusieron de manifiesto que el mutante *gcn20* no reproduce el defecto en la defensa apoplástica del mutante *noxy7*, sino que por el contrario se comporta al igual que las plantas silvestres (Fig. 10A).

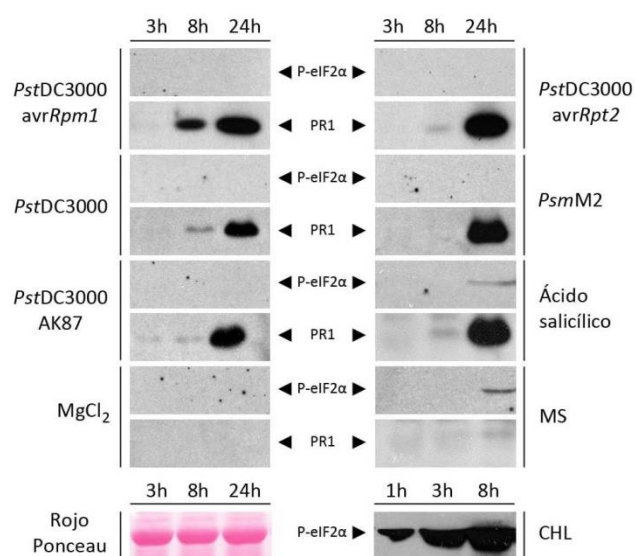


Figura 9. Análisis de la fosforilación de eIF2 α en respuesta a la infección de *Pseudomonas*. Se muestran el nivel de eIF2 α -P y de la proteína PR1, marcadora de la activación de la inmunidad vegetal, en respuesta a la inoculación de las cepas bacterianas: *PstDC3000 avrRpm1*, *PstDC3000*, *PstDC3000 AK87* y *PstDC3000 avrRpt2*, *Pseudomonas maculicola* (*PsmM2*). La inoculación con *MgCl₂* se utilizó como control de la infiltración. Se muestra además la respuesta de plántulas al tratamiento con SA y con clorosulfuron, utilizado como control positivo de la formación de eIF2 α -P. La cantidad de proteína en los geles analizados se examinó en cada caso por tinción de rojo Ponceau.

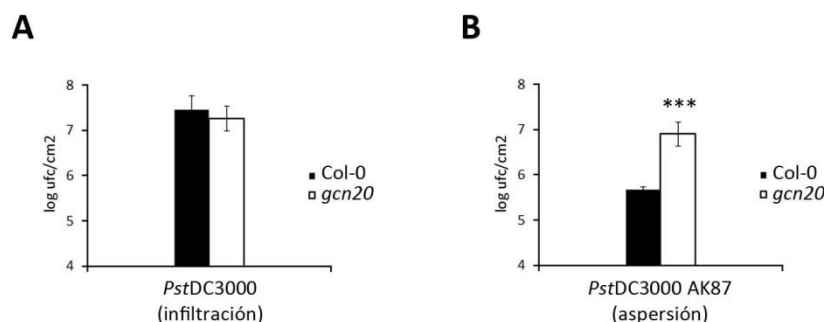


Figura 10. Análisis de la respuesta del mutante *gcn20* a la infección bacteriana. (A) Crecimiento de la cepa *PstDC3000* inoculada por infiltración en plantas silvestres y mutantes *gcn20*. **(B)** Crecimiento bacteriano de la cepa *PstDC3000* AK87 inoculada por aspersión. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a plántulas silvestres (t de Student; ***, $p < 0,001$).

Como confirmación de resultados anteriores (Zeng et al. 2011) observamos que las plantas *gcn20* fueron más susceptibles que las silvestres a la inoculación por aspersión con la cepa deficiente en coronatina *Pst DC3000* AK87 (Fig. 10B). Esto sugiere que a nivel del control de la respuesta de defensa, las proteínas NOXY7 y GCN20 podrían actuar de forma coordinada en el cierre estomático mientras que el control de la defensa apoplástica ejercido por NOXY7 podría ser independiente tanto de GCN2 como de GCN20.

4.4 NOXY7 y GCN20 regulan la respuesta al ácido abscísico y estrés hídrico

La caracterización de los mutantes *noxy7* y *gcn20* había puesto de manifiesto que ambas mutaciones afectan al cierre de los estomas, en respuesta a la percepción de bacterias, así como a la presencia de PAMPs (Zeng et al. 2011), (resultados del laboratorio). Este defecto podría estar limitado a la percepción de PAMPs o a su señalización, o podría constituir un defecto generalizado que impidiera el cierre estomático en respuesta a otras señales implicadas en la activación de este proceso. Para esclarecer este punto, evaluamos la respuesta estomática a la presencia de ABA en ambos genotipos, así como en plantas silvestres utilizadas como control. Análisis previos empleando altas concentraciones de ABA (10 μ M) revelaban que el mutante *noxy7* era capaz de cerrar los estomas de forma similar a las plantas silvestres (resultados del laboratorio). En este trabajo, la utilización de una concentración más baja de ABA (1 μ M) permite observar que los mutantes, *noxy7* y *gcn20* responden a este tratamiento cerrando los estomas y que además son hipersusceptibles a la aplicación de ABA, ya que el cierre de los estomas se favorece en ambos mutantes en comparación con la respuesta de las plantas silvestres (Fig. 11A). De acuerdo a estos resultados, el análisis de la

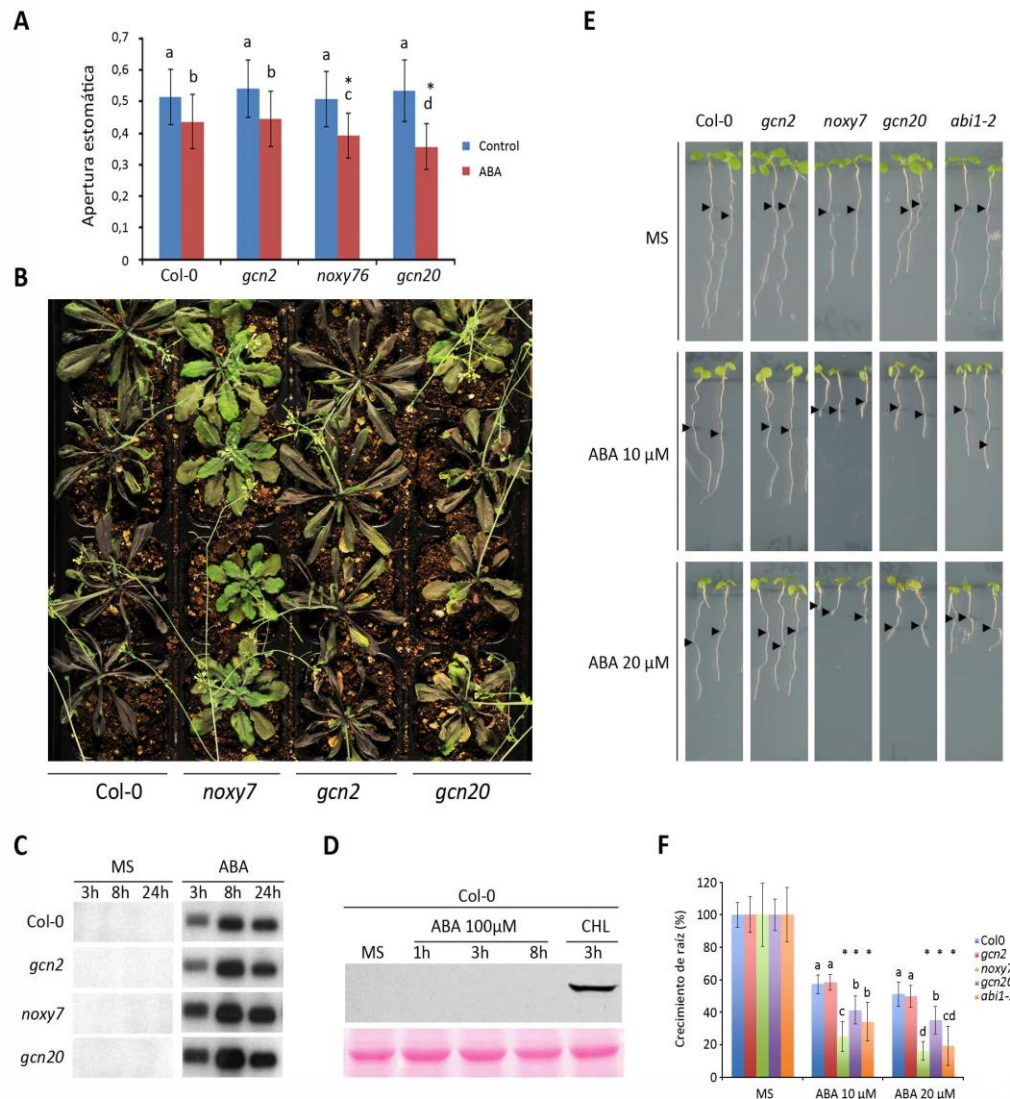


Figura 11. Respuestas de plantas silvestres (Col-0) y mutantes *noxy7*, *gcn2* y *gcn20* a la presencia de ABA y al estrés hídrico. (A) Evaluación del cierre estomático a las 3h del tratamiento con ABA (1 μ M). **(B)** Fenotipo de plantas adultas a las que se les ha retirado el riego durante 10 días. **(C)** Expresión del gen marcador At3g02480 en plántulas tratadas con ABA a diferentes tiempos de tratamiento. **(D)** Detección de la fosforilación del factor eIF2 α en plántulas Col-0 tratadas durante distintos tiempo con ABA. Se examinó la respuesta a clorosulfurón como control positivo de la formación de eIF2 α -P. **(E)** Fenotipo de plántulas crecidas durante tres días en placas MS verticales y transferidas para su crecimiento durante cuatro días adicionales a medio MS suplementado con ABA (10 μ M y 20 μ M). El mutante *abi1-2* hipersensible a ABA, se incluyó como control en estos análisis. Se indica con triángulos negros el tamaño de la raíz en el momento de su traspaso a medio con ABA. **(F)** Evaluación del crecimiento radicular en plántulas transferidas a medio suplementado con ABA o a medio control MS. Las letras diferentes encima de las barras indican las diferencias significativas determinadas (ANOVA, test SNK, $p < 0,05$). Para simplificar la interpretación, se han colocado además asteriscos para representar diferencias significativas respecto a Col-0.

repuesta de plantas adultas a condiciones de estrés hídrico (Fig. 11B) permitió comprobar que cuando las plantas silvestres y los mutantes *gcn2* estaban completamente deshidratados por falta de riego, las plantas *noxy7* presentaban un aspecto mucho más saludable. De la misma manera, los mutantes *gcn20* mostraron un fenotipo de sequía menos acusado que el de las plantas silvestres, aunque la resistencia a esta condición no es tan fuerte como la que se observa en las plantas *noxy7*.

Estos resultados ponían de manifiesto la hipersensibilidad de los mutantes *noxy7* y *gcn20* a la presencia de ABA, proceso que se examinó en más detalle procediendo a evaluar la reducción del crecimiento de la raíz producido por la presencia de la hormona en el medio de crecimiento. La observación del crecimiento radicular en presencia de ABA (10 y 20 μ M) permitió confirmar la hipersensibilidad de los mutantes *noxy7* y *gcn20*, mientras que el efecto del ABA en el mutante *gcn2* fue similar al observado en las plantas silvestres (Figs. 11E, F). El grado de hipersensibilidad de ambos mutantes (*noxy7* y *gcn20*) sin embargo, no fue el mismo.

Así, a ambas concentraciones de ABA la reducción del crecimiento de raíz fue más fuerte en *noxy7*, llegando incluso a superar el efecto mostrado por el mutante hipersensible a ABA *abi1-2* a la concentración de 10 μ M de ABA (Figs. 11E, F). Finalmente, la evaluación de la expresión del gen marcador de ABA At3g02480 (codifica una proteína LEA, *late embryogenesis abundant*), permite observar una mayor acumulación de transcritos en los mutantes *noxy7* y *gcn20* en comparación con *gcn2* y plantas silvestres, mostrando estos últimos un nivel de inducción similar (Fig. 11C).

De forma conjunta los resultados descritos sugieren la participación de las proteínas NOXY7 y GCN20 en la regulación del estrés hídrico de las plantas, en donde actuarían como reguladoras de la respuesta al ácido abscísico. Además, y al igual que en algunos de los tratamientos descritos anteriormente, la falta de diferencias entre la respuesta del mutante *gcn2* y las plantas silvestres permite concluir que el papel regulador de las proteínas NOXY7 y GCN20 es independiente de GCN2. De acuerdo con estos datos, el análisis de eIF2 α permite comprobar que la aplicación de ABA no induce la fosforilación de este factor y que por tanto la respuesta de la planta a ABA es independiente de este proceso (Fig. 11D).

4.5 NOXY7 regula la síntesis de proteínas durante la respuesta de defensa

Los resultados descritos ponen de manifiesto que la proteína NOXY7 participa en la adaptación de las plantas a la alteración de la función mitocondrial y a la presencia de altas

concentraciones de ácido bórico, y que la mutación *noxy7* provoca un aumento en la susceptibilidad de las plantas a estos tratamientos de estrés y una alteración en la tasa de síntesis *de novo* de proteínas. De la misma manera, el estudio funcional de la proteína NOXY7 ha permitido comprobar su participación en la activación de la defensa de la planta y que la mutación *noxy7* interfiere con la activación de la defensa frente a distintas cepas bacterianas. Estos últimos resultados permitían predecir que al igual que la respuesta al estrés mitocondrial y a la presencia de boro, la mutación *noxy7* podría afectar a la síntesis *de novo* de proteínas durante la infección bacteriana. Con objeto de examinar esta posibilidad procedimos a realizar ensayos de incorporación de ^{35}S -Met/Cys en plántulas silvestres y mutantes *noxy7*, tras el tratamiento con suspensiones bacterianas (Ishiga et al. 2011). En estos ensayos pudimos observar, que en las plántulas silvestres el tratamiento con *Pst* DC3000 o *Pst* DC3000 AK87 produce una disminución global de la síntesis de proteínas, que está acompañado de una importante alteración del patrón de proteínas marcadas (Fig. 12). Así, mientras que la intensidad global de la radioactividad incorporada en las plántulas infectadas disminuye claramente en comparación a la observada en las plántulas control, la infección provoca la aparición de proteínas específicas, probablemente relacionadas con la defensa. La diferencia entre estos patrones de incorporación sugiere que, además del componente transcripcional, la acumulación de estas proteínas podría deberse a la traducción selectiva de mensajeros de defensa. El análisis del mutante *noxy7* permitió observar una ligera disminución en la inhibición global de la traducción producida durante la infección de las dos bacterias examinadas, aunque esta variación no era estadísticamente significativa. De la misma manera tampoco se observaron cambios importantes en el patrón de proteínas *de novo* con respecto a las observadas en las plántulas silvestres.

Dado que el modelo de infección en plántulas no nos permitió detectar diferencias entre los genotipos silvestre y mutante, procedimos a utilizar plantas adultas con objeto de examinar si la infección bacteriana provoca cambios en la traducción de mensajeros, y si la susceptibilidad del mutante *noxy7* podría estar asociada a la alteración de este proceso. Para abordar este estudio, y dada la dificultad técnica de hacer marcajes radioactivos *in vivo* en plantas maduras, procedimos a examinar los perfiles polisómicos en plantas silvestres y mutantes *noxy7*, infectadas mediante infiltración con las cepas bacterianas *Pst* DC3000 y *Pst*DC3000 AK87. La abundancia de polisomas es una medida de la actividad de síntesis de proteínas, por lo que sus variaciones durante procesos de infección indicarían cambios traduccionales durante la defensa.

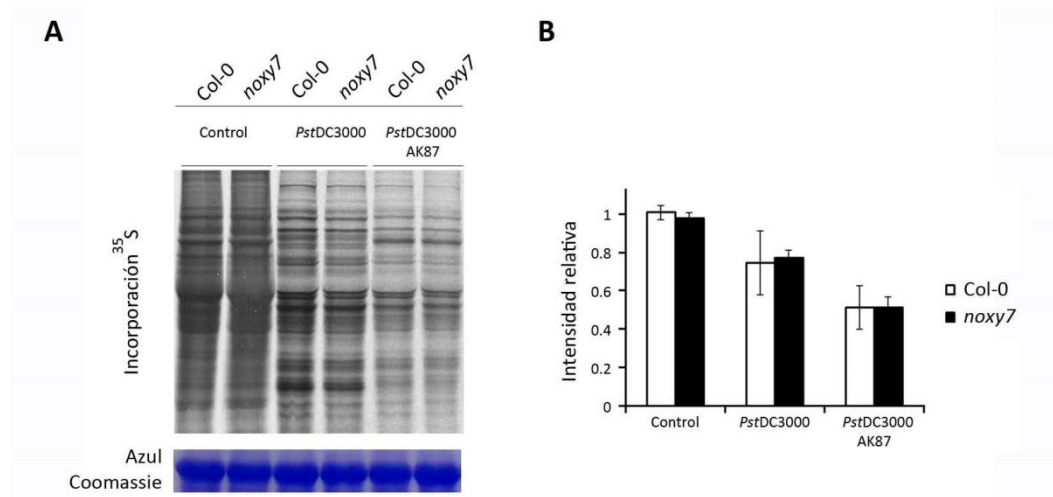


Figura 12. Análisis de la incorporación de ^{35}S (Met/Cys) a proteínas de plántulas silvestres (Col-0) y *noxy7*, 24h después de su inmersión, durante 5 min, en suspensiones bacterianas de *PstDC3000* o *PstDC3000* AK87. (A) Autorradiografía representativa. Se usó la tinción de Coomassie como control de carga. (B) Cuantificación de la radioactividad relativa incorporada, a partir de tres réplicas independientes.

Las condiciones óptimas para realizar estos análisis se determinaron mediante el análisis de la expresión del marcador de defensa PR1 (a nivel de ARN y de proteína) en tejidos de plantas inoculados con una suspensión bacteriana de 10^6 ufc/ml (Fig. 13A). Los resultados de estos ensayos permitieron seleccionar las 24 horas post-tratamiento como el tiempo en el que se observan diferencias más acusadas en las respuestas de las plantas silvestres y del mutante *noxy7*.

A este tiempo se procedió a la preparación de polisomas, utilizando unas condiciones extracción en la que el ARNm se mantuviera unido a los ribosomas, para posteriormente fraccionar los extractos mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa (20-45%). La extracción de ARN de cada fracción y su visualización en geles de agarosa nos permitió identificar la identidad de las subunidades ribosomales presentes en cada una de ellas, detectándose la presencia, en orden creciente de densidad, de ARN libre, subunidades menores (40S), subunidades mayores (60S) y ribosomas activos (monosomas y polisomas, Fig. 13B). La identificación de estas últimas se validó mediante análisis de hibridación frente a una sonda específica del gen *CATALASA 3* (*CAT3*) con altos niveles de expresión constitutiva (Fig. 13C).

Al trazar los perfiles de concentración de ARN correspondientes a las fracciones individuales, se puede apreciar un desplazamiento de la abundancia de ARN, desde las

fracciones polisomales hacia las subunidades libres, durante la respuesta de las plantas silvestres a la infección (Figs. 13D, E). Esta variación no es aparente durante la infección de las plantas *noxy7* (Figs. 13G, H), aunque sí se observa al comparar los perfiles correspondientes a los tratamientos control en plantas silvestres y mutantes, en los que se detecta una proporción menor de ARN en las fracciones polisómicas del mutante *noxy7* (Fig. 13F). La misma conclusión se desprende al calcular la proporción de polisomas en cada condición, mediante la razón:

$$\frac{ARN\ (polisomas)}{ARN\ (total\ de\ fracciones)}$$

Los resultados de estos análisis permitieron comprobar que, la infección de plantas silvestres provoca una reducción en la proporción de polisomas de ~35% durante la infección de la bacteria *Pst* DC3000 y de ~25% en la infección de *Pst* DC3000 AK87 (Fig. 13I). A diferencia de estos resultados, el mutante *noxy7* contiene alrededor de un 40% menos de polisomas que las plantas silvestres en condiciones basales, y su infección indujo un ligero aumento en la proporción de ribosomas activos que, sin embargo, no era estadísticamente significativa (Fig. 13I).

Estos resultados confirman que la defensa de la planta frente a la infección de *Pseudomonas* en *Arabidopsis* produce cambios en las dinámicas ribosomales dependientes de la proteína NOXY7.

4.6 La proteína NOXY7 favorece la traducción de mensajeros de defensa durante la infección

A pesar de sus limitaciones como modelo experimental, el análisis de las proteínas que se sintetizan en plántulas silvestres en respuesta a *Pseudomonas* reveló un cambio drástico respecto a las proteínas que se sintetizan en condiciones basales (Fig.). Si bien es sabido que existen cambios notables en la transcripción de genes durante la activación de la respuesta de defensa, la magnitud de las diferencias observadas sugerían que la traducción de algunos mensajeros podría estar favorecida de forma específica. Para examinar esta posibilidad procedimos a cuantificar el nivel de inducción de genes marcadores de la respuesta de defensa tanto a nivel global como en el conjunto de fracciones de ARN polisómico y estimamos la eficiencia de la traducción de cada transcrito como la razón:

$$\frac{Inducción_{(ARN\ polisomas)}}{Inducción_{(ARN\ total)}}$$

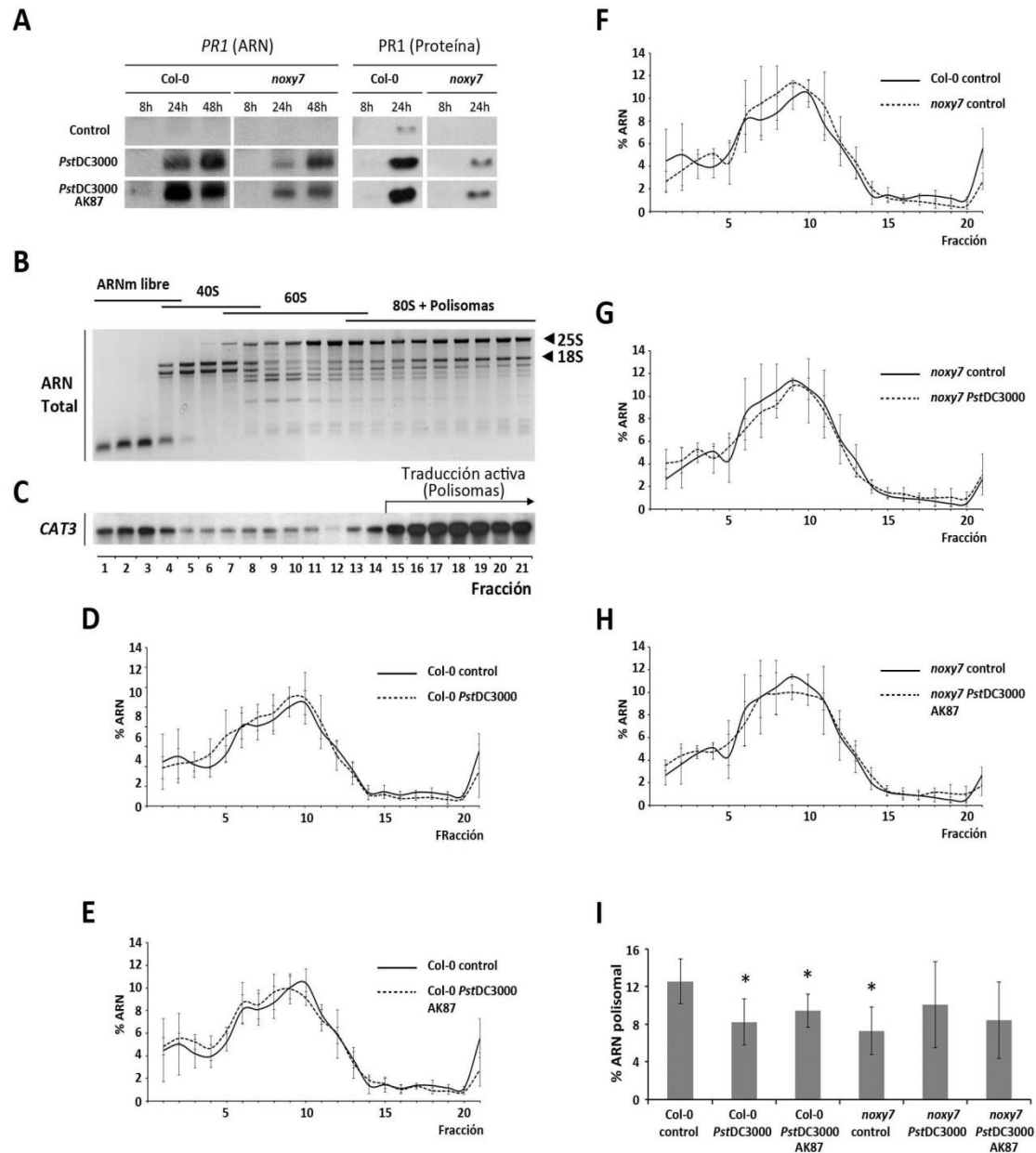


Figura 13. Acumulación diferencial de polisomas en plantas silvestres (Col-0) y noxy7 en respuesta a la infección bacteriana. (A) Análisis del nivel de PR1 (ARN y proteína) tras la infección de las cepas *PstDC3000* y *PstDC3000 AK87* en ambos genotipos. (B) Ejemplo de los perfiles de ARN obtenidos mediante separación en gradientes de sacarosa. Las fracciones polisómicas son identificadas en base a la presencia de los ARNr 18S y 25S, y a la hibridación de una sonda específica del gen constitutivo *CAT3* (C). Comparación de los perfiles ribosomales obtenidos a partir de las concentraciones medias de ARN determinada en cada fracción del gradiente. (D) plantas silvestres control e infectadas durante 24 h con *PstDC3000*, (E) plantas silvestres control y plantas infectadas durante 24 h con *PstDC3000 AK87* (F) plantas silvestres y *noxy7* no infectadas, (G) plantas *noxy7* control e infectadas durante 24 h con *PstDC3000*, (H) plantas *noxy7* control e infectadas durante 24 h con *PstDC3000 AK87*. (I): Proporción media de polisomas en plantas Col-0 y *noxy7* sometidas al tratamiento control (inoculación con $MgCl_2$) o a inoculación con las cepas *PstDC3000* y *PstDC3000 AK87*, definida en cada caso como el porcentaje de ARN presente en el conjunto de fracciones polisómicas.

tomando como condición basal las plantas silvestres control. Como gen de referencia para la cuantificación usamos el ARN ribosomal 18S cuya fluctuación puede ser estimada mediante *Bioanalyzer* (Agilent) para corregir el cálculo de los valores de expresión relativa.

Los resultados de estos análisis permitieron observar altos niveles de inducción de los genes marcadores de la ruta del SA, *PR1* e *ICS1*, y en menor medida de los genes de defensa *PR2* y *PR5* en las plantas silvestres (Fig. 14A). El nivel de inducción evaluado fue en todos los casos mayor en la infección con *Pst* DC3000 AK87 que con *Pst* DC3000, consistente con el efecto represor de la defensa ejercido por la toxina coronatina, presente en la cepa virulenta *Pst* DC3000. La inducción de estos genes fue inferior en el mutante *noxy7*, a excepción del gen *PR2* cuya inducción en la respuesta a la infección de *Pst* DC3000 fue superior en el mutante *noxy7* que en las plantas silvestres. Por otro lado, el análisis de la expresión de los genes constitutivos *ACT8* y *RBCS-1A* permitió observar un pequeño aumento en los niveles de transcritos en respuesta a la infección con ambas cepas, alcanzando niveles similares en las plantas silvestres y en el mutante *noxy7*. Estos resultados ponían de manifiesto el defecto del mutante *noxy7* en la activación de la expresión de los genes de defensa examinados.

La evaluación de estos mismos transcritos en las fracciones de ARN polisomales (Fig. 14B), reveló la inducción de los marcadores de defensa analizados en las plantas silvestres, y que los niveles detectados eran superiores a los que cabría esperar, teniendo en cuenta su nivel de inducción global. Estos resultados permiten suponer que la eficiencia de traducción de los transcritos examinados aumenta durante la infección de forma específica. Los valores determinados ponen de manifiesto, que la eficiencia de traducción aumenta de acuerdo a la cepa bacteriana examinada entre el 30-40% en el caso del gen *PR1*, del 70-90% en el gen *ICS1*, en más del 100% en *PR5* y hasta más del 200% en *PR2*, respecto a las condiciones control (Fig. 14C). Los resultados obtenidos tras el análisis de los genes constitutivos, no permite detectar diferencias importantes en la eficiencia de la traducción del transcrito *ACT8*, durante la respuesta a la infección con ninguna de las dos cepas examinadas (un 3% más con *Pst*DC3000 y un 7% menos con *Pst*DC3000 AK87 respecto al control). De la misma manera, la traducción de *RBCS-1A* fue muy similar en las dos infecciones examinadas (alrededor de un 5% menos en ambos casos). Estos resultados indican que la traducción preferencial de los genes de defensa podría formar parte de los mecanismos de activación de la respuesta inmune vegetal.

La cuantificación de transcritos en el ARN polisomal del mutante *noxy7* reveló un comportamiento opuesto al de las plantas silvestres. Así, en este mutante, no solo no se observó un enriquecimiento en la fracción polisómica de los mensajeros de defensa analizados

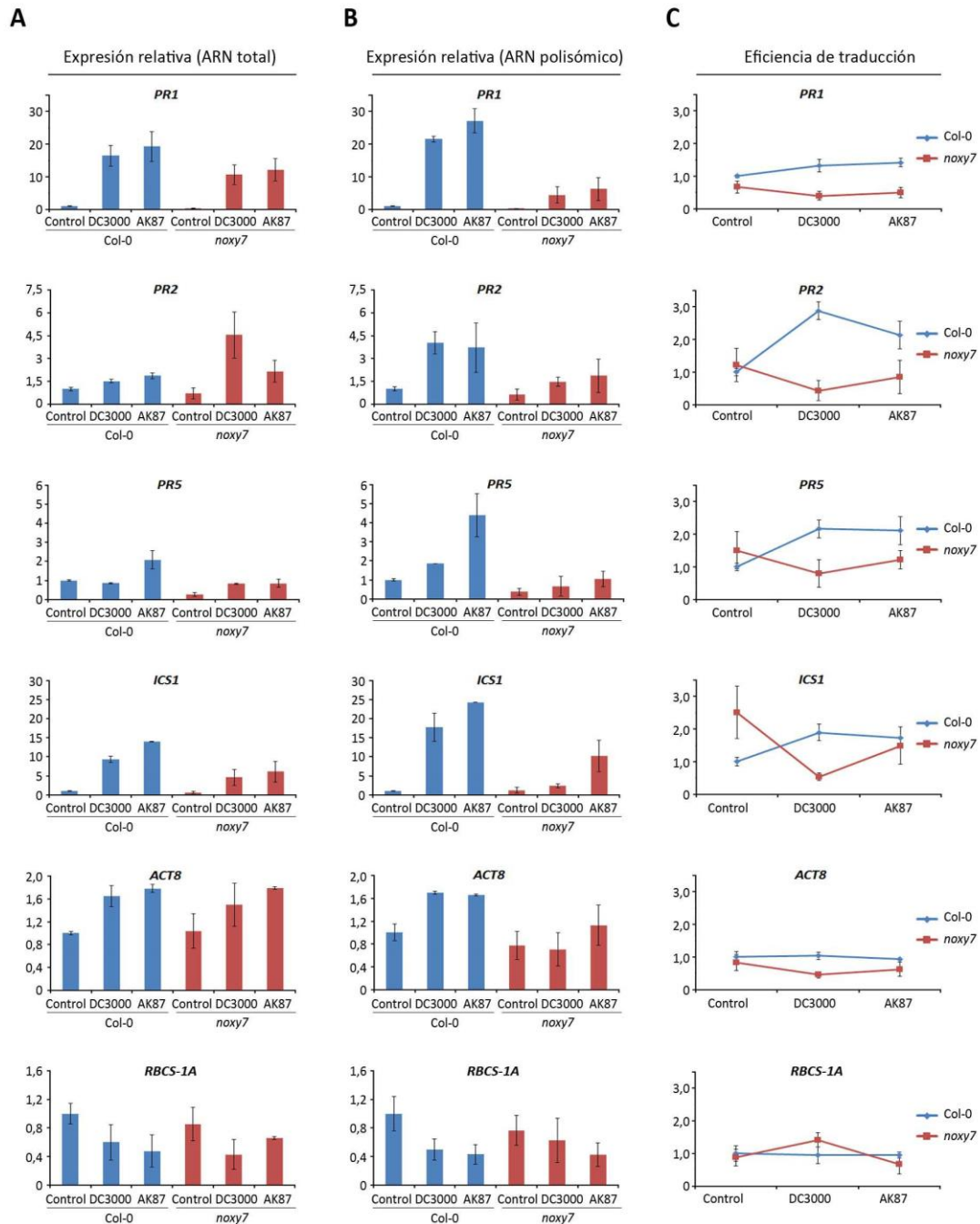


Figura 14. Cuantificación de la expresión de genes constitutivos y genes de defensa vegetal en muestras de ARN total y de ARN polisómico obtenidas a partir de plantas silvestres (Col-0) y mutantes *noxy7*. Se inocularon plantas de 4 semanas de ambos genotipos con las cepas *PstDC3000*, *PstDC3000* AK87, o tampón de infiltración (control). Se determinaron los valores de expresión relativa en las muestras de ARN total (**A**) y de ARN polisómico (**B**) de los marcadores de defensa *PR1*, *PR2*, *PR5* y *ICS1*, y de los genes constitutivos *ACT8* y *RBCS1-A*. Se consideró la razón entre ambos valores (polisómico/total) para cada transcrito como la eficiencia de traducción en cada caso. (**C**) Eficiencia de traducción de los transcritos examinados en relación a las correspondiente a las plantas Col-0. La eficiencia de traducción en las muestras control de las plantas silvestres se utilizó como referencia tanto para el ARN total como el polisómico.

sino que los niveles fueron menores a los de los valores de inducción detectados a nivel transcripcional (Fig. 14A, B). En consecuencia, las eficiencias de traducción de estos genes durante la infección disminuyeron respecto a las condiciones control en plantas *noxy7*. La reducción de la eficiencia traduccional se observa especialmente en la infección de la bacteria *Pst* DC3000 (Fig. 14C) en donde las eficiencias calculadas bajaron cerca de un 40% en los transcritos *PR1*, de un 65% para el gen *PR2*, 45% en *PR5* y 55% en *ICS1*. Estas disminuciones fueron menos pronunciadas durante la infección con la cepa atenuada *Pst* DC3000 AK87, alcanzando siempre valores intermedios entre el control y los correspondientes a la infección de *Pst* DC3000. Curiosamente, la eficiencia de la traducción de los transcritos *ACT8* en el mutante *noxy7* mostró el mismo patrón que el de los genes de defensa, reduciéndose en un 45% en la infección de *Pst* DC3000 y en un 25% en la bacteria *Pst* DC3000 AK87, mientras que el de los transcritos *RBCS-1A* aumentó un 40% en la respuesta a *Pst* DC3000 y disminuyó en un 33% en el caso de *Pst* DC3000 AK87.

Estos resultados sugieren que las plantas favorecen la síntesis de proteínas de defensa de forma selectiva a través de un mecanismo post-transcripcional dependiente del gen *NOXY7*.

4.7 Influencia de la composición ribosomal en la defensa vegetal

Nuestros resultados revelan, que las plantas poseen mecanismos para regular la síntesis de proteínas ante situaciones de estrés, que afectan, tanto a la tasa global de síntesis, como a la de mensajeros específicos de la respuesta, en un proceso en el que interviene la proteína *NOXY7*. Si bien en otros organismos el gen ortólogo de *NOXY7*, *GCN1*, ha sido relacionado con procesos adaptativos frente a determinadas respuestas, en la mayoría de los casos, la acción de la proteína *GCN1* ha sido accesoria a la actuación de la quinasa *GCN2* y de la fosforilación del factor de iniciación *eIF2 α* , en lo que constituye un circuito de regulación ampliamente conservado. En *Arabidopsis*, sin embargo, nuestros resultados han puesto de manifiesto la participación de las proteínas *NOXY7/GCN1* y *GCN20* en la adaptación de las plantas a situaciones de estrés biótico y abiótico, y que a diferencia de lo que ocurre en otros organismos, la regulación de estas respuestas es independientes de la participación de las proteínas *GCN2* y *eIF2 α -P*. Esta circunstancia constituye una singularidad que distingue a las plantas de otros eucariotas, tales como las levaduras y los mamíferos, en los que se han hecho la mayor parte de los estudios sobre este sistema de regulación.

Una segunda particularidad observada al analizar los perfiles de ARN ribosomal correspondientes a las plantas silvestres, se refiere a que la proporción de subunidades

ribosomales libres, observadas en condiciones basales, es notablemente más alta que la que se observa en perfiles similares de levaduras o mamíferos (Saini et al. 2009; Morello et al. 2011). En base a esta observación, nos propusimos explorar si la composición de los ribosomas citoplasmáticos en *Arabidopsis* pudiera afectar a la regulación de la traducción, durante la respuesta frente a la infección de patógenos.

4.7.1 Las familias de proteínas ribosomales en *Arabidopsis* son más poligénicas y diversas estructuralmente que en levaduras y mamíferos

Los ribosomas están constituidos por dos subunidades, cada una de las cuales está a su vez formada por ARNr y un conjunto de proteínas. De ahí que usualmente se imagine al ribosoma como un *puzzle* tridimensional en el cual, sobre el esqueleto de ARNr, se colocan las piezas que constituyen las proteínas ribosomales. Esta visión obvia, sin embargo, que no siempre existe un único miembro por cada familia de proteínas ribosomales y que, por tanto, cada posición del *puzzle* puede rellenarse con más de una pieza, generando una combinatoria variable que podría originar un número elevado de ribosomas distintos. De esta manera, cuanto más diferencias existan entre los miembros de cada familia proteica, será mayor el número de combinaciones que puedan establecerse y, por tanto, el número de variantes ribosomales que, a su vez, podrían distinguir entre distintos mensajeros actuando como “filtros” traduccionales.

Con objeto de estimar la heterogeneidad ribosómica que podría existir en *Arabidopsis*, en comparación con la correspondiente a levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y a humanos (*Homo sapiens*), procedimos a examinar los miembros de cada familia de proteínas ribosomales en las tres especies seleccionadas (Fig. 15). Este análisis nos permitió observar que, mientras que en humanos la mayoría de las familias están constituidas por un único componente, las levaduras poseen entre 1 y 2, y en *Arabidopsis* casi todas ellas poseen más de dos miembros (hasta 6 para la familia S19) (Figs. 15A, B). Por otro lado, la distribución del número de proteínas por familia, dentro de cada especie, es similar en ambas subunidades ribosomales, lo que sugiere la evolución coordinada de ambas subunidades, con respecto a la poligenia de las familias proteicas que las componen. En términos cuantitativos, en humanos encontramos de media 1,21 proteínas distintas por cada familia de proteínas que forma parte de la subunidad grande del ribosoma, y 1,15 para en el caso de la subunidad pequeña; en levaduras estos valores son respectivamente de 1,5 y 1,45, mientras que en *Arabidopsis* los valores calculados ascienden a 2,55 y 2,7. Estos cálculos permiten estimar que la cantidad de

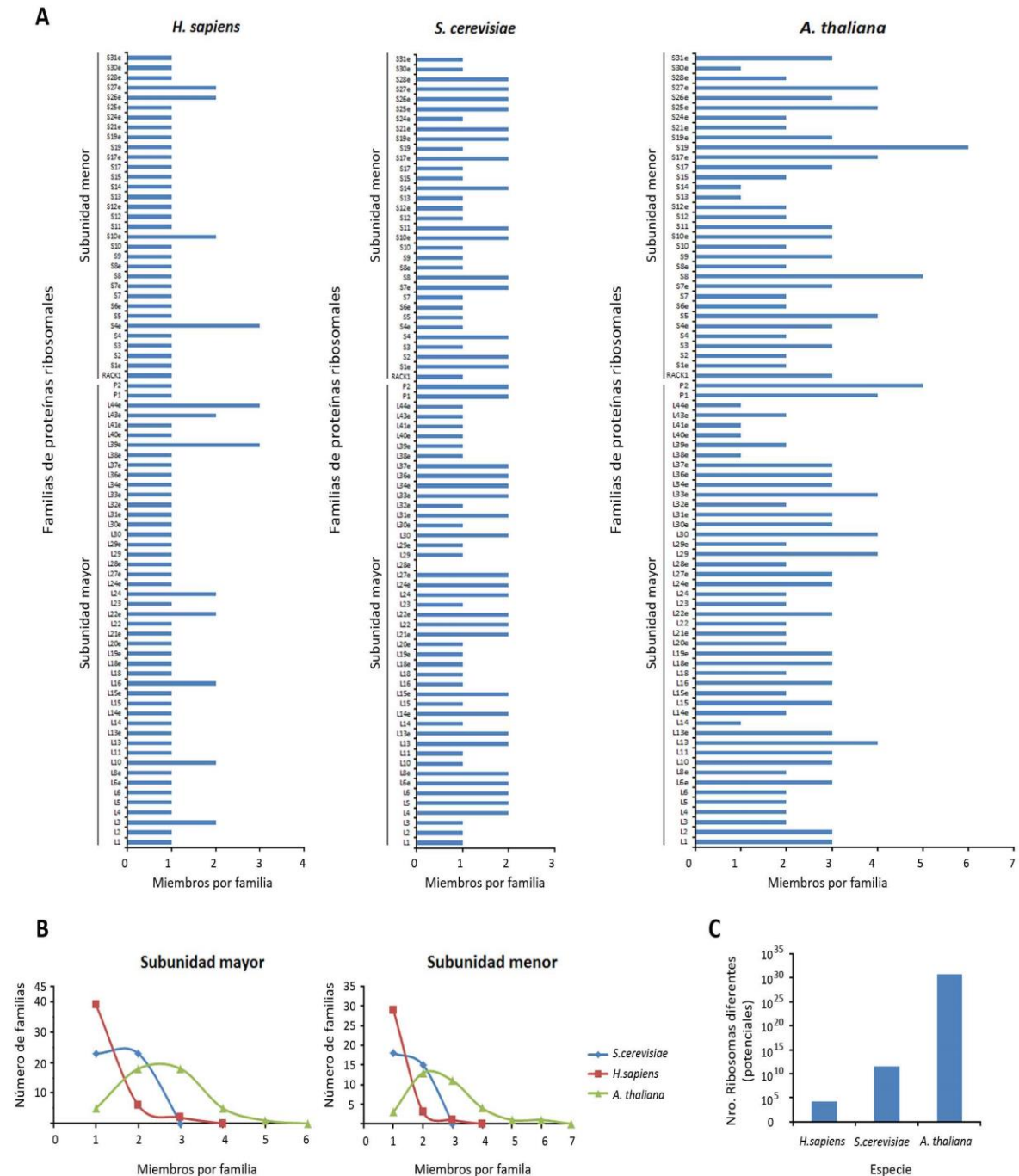


Figura 15. Distribución de proteínas ribosomales en humanos (*H. sapiens*), levaduras (*S. cerevisiae*) y plantas (*A. thaliana*). (A) Número de genes distintos que integran cada familia de proteínas ribosomales en cada una de las especies analizadas. (B) Distribución de la frecuencia del número de miembros por familia. (C) Se muestra el número potencial de ribosomas diferentes que podrían formarse en cada una de las especies examinadas.

ribosomas distintos que podrían formarse en cada una de las especie analizadas alcanzaría a unos 14.000 en humanos, $2,7 \times 10^{11}$ en levaduras y $5,8 \times 10^{30}$ en *Arabidopsis* (Fig. 15C). Es evidente, por tanto, que en *Arabidopsis* existe una cantidad mayor de proteínas ribosomales por familia, en comparación con otras especies. No obstante, para concluir si esto conduce a una diversidad estructural mayor de los ribosomas, es necesario examinar también las diferencias que existen entre los distintos miembros de cada familia. Para ello realizamos, en cada una por separado, el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de todos los pares de miembros posibles, y promediamos los porcentajes de identidad de secuencia. El valor así obtenido se consideró como la identidad promedio de la familia. (Fig. 16). Los resultados de estos análisis permiten determinar que, en el caso de la subunidad mayor en humanos, la identidad promedio de las familias fue de un 98,2%, muy similar a la encontrada en levaduras (96,8%), y que en ambos casos este valor era significativamente superior a la identidad media evaluada en *Arabidopsis* (90,7%). La comparación de las familias que conforman la subunidad pequeña, revela un patrón similar: 99,3% en humanos, 98,6% en levaduras y 91,8% en *Arabidopsis*, siendo esta última significativamente menor que las dos anteriores. Los resultados de estos análisis permiten concluir, que las familias de proteínas ribosomales de *Arabidopsis* son, no solo más poligénicas que las de otras especies, sino que también difieren más entre sí desde el punto de visto estructural.

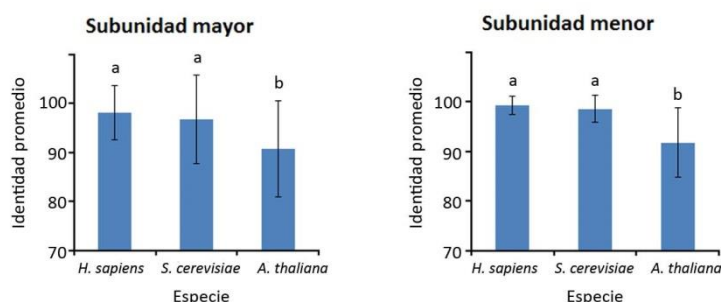


Figura 16. Diversidad de secuencia entre los miembros de las familias proteicas ribosomales identificadas en humanos (*H. sapiens*), levaduras (*S. cerevisiae*) y plantas (*A. thaliana*). (A) Se representa el promedio de los porcentajes de identidad entre los miembros de cada familia de proteínas que integran la subunidad mayor del ribosoma. (B) Se muestra el promedio de los porcentajes de identidad entre los miembros de cada familia de proteínas que integran la subunidad menor del ribosoma. Las letras diferentes simbolizan medias estadísticamente diferentes en cada caso (ANOVA, test de Tamhane, $p < 0,05$).

4.7.2 La proporción de proteínas ribosomales cambia durante la defensa vegetal

Los resultados descritos ponen de manifiesto, que la capacidad para generar ribosomas distintos en *Arabidopsis* es superior a la de otros organismos. La diversidad ribosómica podría constituir un factor regulador de la traducción de mensajeros, en cuyo caso, la expresión de las proteínas ribosomales podría variar de acuerdo a las condiciones de estrés en las que pudieran participar regulando de la traducción.

Para comprobar esta hipótesis, procedimos a utilizar la base de datos de expresión de genes Genevestigator con objeto de examinar los valores de expresión de cada uno de los genes que codifican proteínas ribosomales en *Arabidopsis*, en todos aquellos experimentos relacionados con la defensa vegetal depositados en este repositorio (un total de 229). Para determinar si durante estas respuestas los miembros de cada familia experimentaban cambios similares, procedimos a definir para cada una de las familias examinadas dos parámetros que denominamos variabilidad inicial y variabilidad interna. La variabilidad inicial (V_0) es la medida del cambio en el nivel de expresión de la familia como conjunto en cada tratamiento analizado, mientras que la variabilidad interna (V_{int}) representa la diferencia entre los perfiles de expresión de los miembros de la familia en este mismo tratamiento. De esta manera, la diferencia $V_{int} - V_0$ nos indica si los perfiles de expresión de los miembros de cada familia son, de media, convergentes ($V_{int} - V_0 < 0$) o divergentes entre sí ($V_{int} - V_0 > 0$) como se

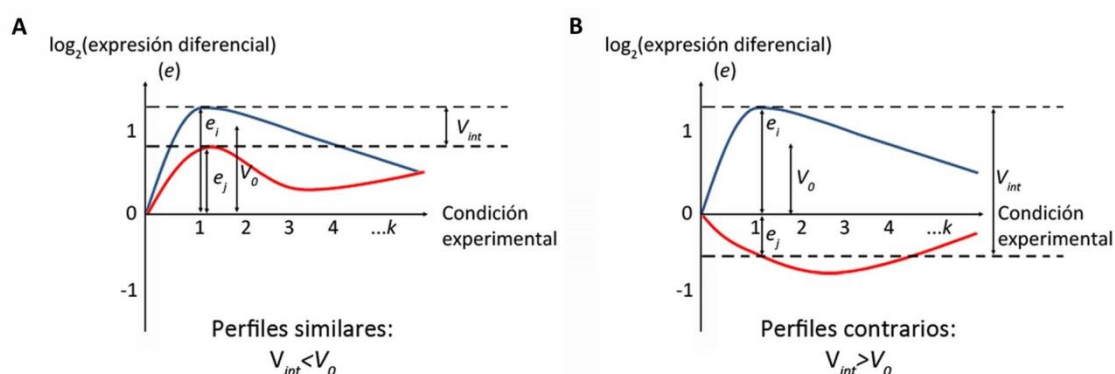


Figura 17. Ejemplo ilustrativo de genes con perfiles de expresión similares (A) o divergentes (B). A partir de los valores de expresión (e_i, e_j) de dos genes (azul y rojo) en un conjunto de condiciones (k) se calculan la distancia entre ambos perfiles (variabilidad interna, V_{int}) y la distancia promedio de cada gen respecto a un perfil constitutivo (variabilidad inicial, V_0). Para dos genes cuya expresión (e_i, e_j) varíe en general en el mismo sentido (caso A, perfiles similares) se obtiene una diferencia $V_{int} - V_0 < 0$, mientras que si los valores de expresión varían en general en sentido contrario (caso B) se obtiene una diferencia $V_{int} - V_0 > 0$.

ilustra en la Fig. 17. El resultado de estos análisis permite comprobar que 16 de las 41 familias proteicas ribosomales pertenecientes a la subunidad grande, y 9 de las 28 de la subunidad pequeña mostraron perfiles de expresión divergentes sugiriendo que sus miembros podrían tener funciones diferentes durante la inmunidad vegetal (Tabla S1). Para analizar si esta divergencia de expresión se correlaciona con la diversidad de secuencia calculada anteriormente, procedimos a representar en una gráfica ambos valores, para cada una de las familias, y a identificar para cada subunidad las familias con alta diversidad de secuencia y de expresión al mismo tiempo (Fig. 18). En este sentido, los casos más relevantes corresponden a las familias L2, L3, L13e, L15, L22e, L30e, L43e, S2, S4, S8, S9, S19. De hecho, en ambas subunidades, encontramos una correlación positiva significativa para las dos magnitudes, lo que sugiere una estrategia evolutiva dirigida a generar ribosomas específicos durante la respuesta de defensa (Figs. 18A,B).

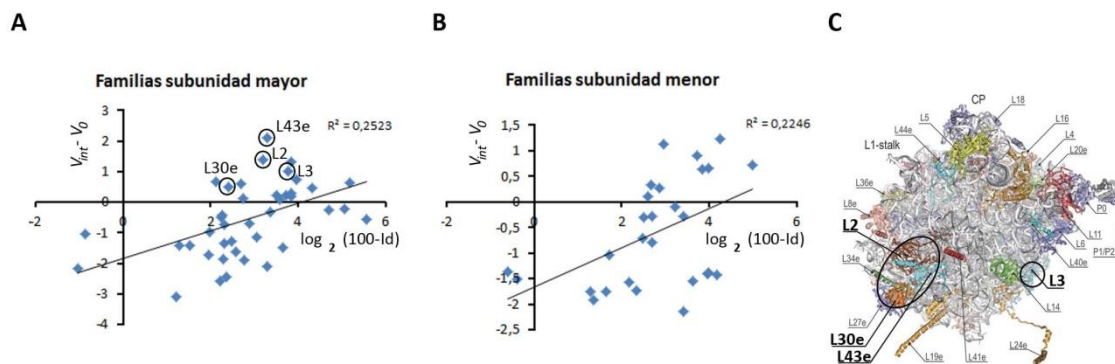


Figura 18. Correlación entre las divergencias de expresión y secuencia, durante la activación de la defensa vegetal. (A) Familias de proteínas ribosomales pertenecientes a la subunidad mayor en *Arabidopsis*. **(B)** Familias de proteínas ribosomales pertenecientes a la subunidad menor en *Arabidopsis*. Se muestra la dependencia entre la divergencia de expresión ($V_{int} - V_0$) y la de secuencia ($\log(100 - Id)$) para cada familia, donde V_{int} y V_0 son, respectivamente, la variabilidad de expresión interna e inicial de cada familia, mientras que Id es el promedio de identidad de secuencia entre cada par de miembros de la misma familia. En cada caso se indica el coeficiente de correlación entre ambas variables y su significación (**, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$). Se destacan en **(A)** familias con altos valores de divergencia, tanto de expresión como de secuencia, que a la vez forman parte de (o se ubican adyacentes a) sitios de unión entre las dos subunidades ribosomales: L2, L30e y L43e (puente B7b/c) y L3 (puente eB13). **(C)** Posición que ocupan estas familias en la estructura del ribosoma (modificado a partir de (Tibshirani et al. 2011)).

4.7.3 Las familias de proteínas ribosomales L2 y L30e modulan la respuesta de defensa.

La correlación positiva entre la divergencia de secuencia y de los perfiles de expresión de las proteínas ribosomales en *Arabidopsis* sugiere, que durante la respuesta de defensa la composición de los ribosomas podría variar con respecto a la que existe en condiciones basales. La inspección de las familias que presentan mayor diversidad, tanto en la secuencia de sus miembros, como en sus perfiles de expresión, revela que varias de ellas forman parte de los puntos de contacto (llamados “puentes”) que unen las dos subunidades ribosomales y que controlan la afinidad entre ellas. En concreto, las proteínas L3 forman parte del puente eB13; las L2 y L43e forman parte del B7b/c, y las L30e se colocan contiguas al mismo en la arquitectura de la subunidad mayor (Fig. 18C) (Tibshirani et al. 2011).

Para corroborar experimentalmente que los miembros de estas familias intervienen en la respuesta de defensa, seleccionamos mutantes en genes de las familias L2 (*l2b*) y L30e (*l30e1*, *l30e2*) y procedimos a realizar una evaluación preliminar de sus respuestas de defensa. Con este fin, inoculamos por infiltración con la bacteria *Pst* DC3000 tanto plantas silvestres, como los mutantes mencionados. Como resultado de estos análisis pudimos comprobar, que las plantas *l2b* eran más resistentes que las plantas silvestres a la infección; mientras que dentro de los mutantes de la familia L30e, se distinguieron dos tipos de respuesta, así las plantas *l30e2* eran también más resistentes a la infección y los mutantes *l30e1* resultaron más susceptibles, en comparación con las plantas silvestres (Fig. 19). Estos resultados demuestran

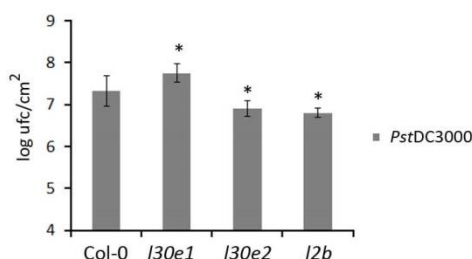


Figura 19. Análisis de la respuesta de defensa apoplástica de los mutantes *l30e1*, *l30e2* y *l2b* comparada con la de plantas silvestres (Col-0). Evaluación del crecimiento de la cepa *Pst*DC3000 inoculada por infiltración. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto a Col-0 (t de Student, $p < 0,05$).

que los miembros de las familias L2 y L30e podrían participar en la respuesta de defensa, y sugieren, que el resto de las familias proteicas ribosomales antes mencionadas, podrían participar, igualmente, en esta respuesta en la que podría realizar funciones específicas en la regulación de la traducción de los mensajeros.

Discusión

5. DISCUSIÓN

El mutante *noxy7* fue seleccionado en un escrutinio genético dirigido a la identificación de plantas mutantes insensibles a la aplicación de 9-HOT, uno de los derivados lipídicos u oxilipinas, producido a través de la ruta de síntesis iniciada por la acción de las 9-lipoxigasas. De acuerdo a la participación de las 9-LOX en la activación de la resistencia vegetal frente a la infección de la bacteria *Pst* DC3000, la caracterización del mutante *noxy7* había puesto de manifiesto que la mutación *noxy7* interfiere con la activación de la defensa tanto a nivel preinvasivo como apoplástico (Kulasekaran 2012).

La mutación *noxy7* fue localizada al final del 21^{er} intrón del locus At1g64790 y provoca la retención de dicho intrón en el ARN mensajero. Dado que el número de bases retenidas (78) es múltiplo de 3, la proteína mutante predicha contendría una inserción de 26 aminoácidos en la posición 1043 de la cadena peptídica, que conservaría el marco de lectura original a partir de dicha inserción. El locus At1g64790 codifica para una proteína de 2610 aminoácidos, que presenta una estructura de tipo ARM (*armadillo-type fold*) y repeticiones HEAT que permiten la interacción con otras moléculas de gran tamaño tales como el ARN u otras proteínas. Estas características permiten a su ortólogo en levaduras, GCN1, unirse a GCN20 y actuar como anclaje al ribosoma para facilitar la activación de la quinasa GCN2. Esta a su vez fosforila al factor de inicio de la traducción eIF2 α para facilitar la inhibición de la síntesis de proteínas. Este circuito regulatorio que se activa en respuesta a condiciones de estrés nutricional, ralentiza de forma global, el inicio de la síntesis de proteínas, a la vez que potencia la traducción del factor de transcripción GCN4 (ATF4 en mamíferos y *C. elegans*) que activa la expresión de los genes que participan en la adaptación al estrés y la recuperación de la homeostasis de nutrientes. El sistema GCN1-GCN20-GCN2-eIF2 α -P está ampliamente conservado en organismos tan distantes como levaduras, mamíferos, *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila melanogaster*, lo que permitía predecir su participación en la respuesta de las plantas durante la activación de la respuesta de defensa, en la que el mutante *noxy7* se encuentra afectado.

Nuestros resultados en la caracterización de este sistema de regulación, ante esta y otras respuestas a estrés, nos permiten esbozar un modelo de actuación de sus componentes en plantas (Fig. 20) que, sin embargo, difiere sustancialmente del paradigma aceptado a partir del modelo de levaduras.

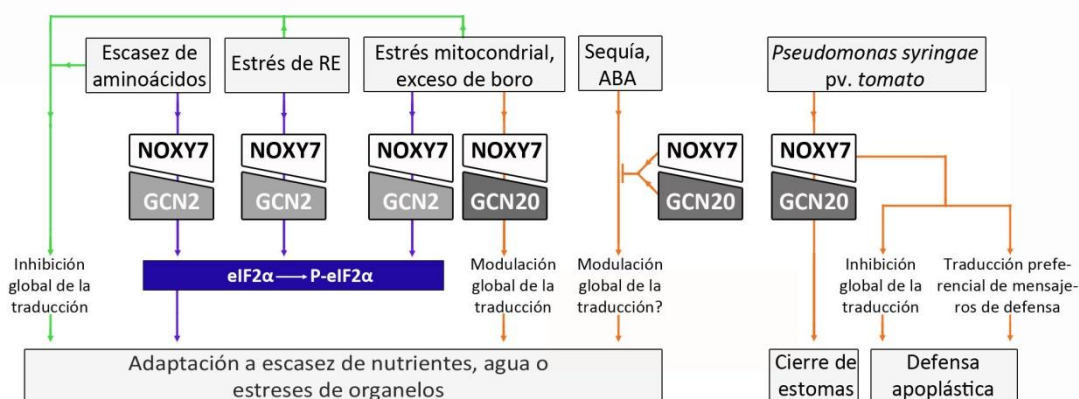


Figura 20. Modelo propuesto para la acción de NOXY7, GCN2 y GCN20 en la regulación de la traducción durante la respuesta a estrés de *Arabidopsis*. En condiciones de escasez de aminoácidos, alteración del plegamiento de proteínas en el RE, estrés mitocondrial o exceso de boro, la proteína NOXY7 participa en la activación de la quinasa GCN2 y de la formación de eIF2α-P (flechas azules). En el caso de la escasez de aminoácidos, esta respuesta modularía la adaptación de las plantas y posiblemente conllevaría la traducción diferenciada de mensajeros específicos. Además, todos estos tratamientos provocan la inhibición global de la síntesis de proteínas por una ruta independiente a NOXY7 y GCN2 (flechas verdes). De manera paralela a estos procesos, NOXY7 y GCN20 actúan de forma coordinada (flechas naranja) en la respuesta a los tratamientos de estrés mitocondrial y exceso de boro, en la que modulan la síntesis de proteínas favoreciendo la adaptación. Además, ambas proteínas NOXY7 y GCN20, actúan como reguladores negativos de la señalización de ABA y participan en la activación de la respuesta defensa pre-invasiva durante la infección de *P. syringae* favoreciendo el cierre de los estomas. NOXY7 tiene un papel adicional en la defensa apoplástica frente a esta bacteria, participando en la regulación de la síntesis de proteínas que conlleva la bajada de la traducción de un porcentaje de mensajeros, mientras que se potencia traducción de mensajeros específicos de defensa. La participación de la proteína GCN20 en este proceso no ha sido examinada.

5.1 Papel de GCN1, GCN2 y eIF2α-P en la regulación de la síntesis de proteínas

Los resultados de nuestro estudio apoyan la hipótesis que proponía que GCN2 es la única eIF2α-quinasa presente en *Arabidopsis*. Esta conclusión se basa en los resultados que muestran que la fosforilación del factor de iniciación, en respuesta a una gran variedad de condiciones de estrés (inhibición de la síntesis de aminoácidos, estrés mitocondrial, estrés por mal plegamiento de proteínas, ácido bórico) se inhibe en el mutante *gcn2*. De la misma manera, ninguno de los tratamientos inductores de eIF2α-P en las plantas silvestres, activó la fosforilación del factor eIF2α en el mutante *noxy7*, ni en el alelo *ila3*, lo que indica, en consonancia con estudios de otros autores (Lageix et al. 2008; Wang et al. 2016), que el circuito GCN1-GCN2-eIF2α-P está conservado en *Arabidopsis* y que las proteínas NOXY7 y GCN2 participan en la activación de la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2α.

La caracterización detallada de este sistema de regulación nos permitió identificar, sin embargo, diferencias relevantes en *Arabidopsis* que distinguen la participación de estas proteínas en la adaptación de las plantas a estrés, en comparación con los resultados obtenidos en otros organismos. En primer lugar, y a diferencia de lo que ocurre en levaduras, en donde la proteína GCN20 es necesaria para la fosforilación del factor eIF2 α , el mutante *gcn20* de *Arabidopsis* producía niveles de eIF2 α -P similares a los detectados en las plántulas silvestres en respuesta a todos los tratamientos examinados. Por otro lado, mientras que los mutantes *noxy7* y *gcn20* comparten el mismo tipo de alteraciones fenotípicas (ligera reducción de tamaño, hojas más jóvenes con color verde más pálido), las plantas de *gcn2* son indistinguibles de las silvestres, lo que sugería que, si bien en plantas GCN1 y GCN2 funcionaban coordinadamente regulando la producción de eIF2 α -P, la proteína GCN1 podría haber adquirido funciones adicionales en las que actuaría de forma coordinada con GCN2 e independientemente de GCN2 y de su actividad quinasa.

Para examinar esta posibilidad y distinguir las funciones del gen *NOXY7* que pudieran estar ligadas a la fosforilación de eIF2 α de aquellas en las que pudiera actuar en coordinación con la proteína GCN20, procedimos a analizar las ventajas adaptativas que pudieran estar asociadas a la inhibición de la síntesis de proteínas regulada por la acción de GCN2-eIF2 α -P, y a determinar hasta qué punto estas dependían de GCN1/NOXY7. En este sentido, y como cabría esperar, encontramos que el tratamiento con un inhibidor de síntesis de aminoácidos ramificados (clorosulfurón, CHL) era más perjudicial tanto para *gcn2* como para *noxy7* en comparación con el efecto observado en las plántulas silvestres, lo que apoyaba la idea de que la fosforilación de eIF2 α favorece la adaptación de las plantas a la carencia de aminoácidos. A diferencia de estos resultados, el tratamiento con el inhibidor de la síntesis de glutamina, PPT, que induce igualmente la formación de eIF2 α -P, reveló que las mutaciones *noxy7* y *gcn2* confieren resistencia frente a este herbicida, sugiriendo que en este caso la fosforilación de eIF2 α tiene un efecto negativo para la adaptación de las plantas. Por último, cabe mencionar que la respuesta frente al tratamiento con DTT (que interfiere con plegamiento de las proteínas) no reflejaba diferencias fenotípicas entre los mutantes *noxy7* y *gcn2* y las plántulas silvestres, a pesar de que el DTT induce la formación de altos niveles de eIF2 α -P.

Estos resultados indicaban que la fosforilación de eIF2 α modula la adaptación de las plantas a estreses relacionados con la homeostasis de la síntesis proteica pero que, a diferencia de lo que ocurre en levaduras, la formación de eIF2 α -P no favorece necesariamente la adaptación de las plantas a las condiciones de estrés inductoras de este proceso.

La divergencia funcional de este mecanismo de regulación es todavía más evidente cuando se analiza la relación entre la fosforilación de eIF2 α y la inhibición de la traducción. En levaduras y mamíferos, la privación de aminoácidos produce una bajada sensible en la tasa de traducción; esta bajada se atenúa significativamente si se boquea la fosforilación del factor eIF2 α . Nuestros resultados indican, sin embargo, que en presencia de CHL, la inhibición de la síntesis de proteínas es igual en plantas silvestres que los mutantes *gcn2* y *noxy7*, lo que pone de manifiesto que la fosforilación de eIF2 α no es la causa de esta bajada. De hecho, la producción de eIF2 α -P no está necesariamente asociada a una inhibición de la traducción, como se concluye del hecho de que el tratamiento con PPT induce altos niveles de eIF2 α -P pero no va acompañado de la inhibición de la traducción ni en las plantas silvestres, ni en los mutantes *gcn2* o *noxy7*. Estos resultados no permiten adjudicar un papel relevante a la formación de eIF2 α -P en las plantas, lo que coincide con la ausencia de un gen similar a *GCN4*, y con las inconsistencias descritas acerca del papel de *GCN2* en la adaptación de las plantas al tratamiento con herbicidas que inhiben la síntesis de aminoácidos (Zhang et al. 2008; Faus et al. 2015).

Una posibilidad que podría explicar nuestros resultados con el mutante *gcn2* es que en la mayoría de los estudios anteriores se ha usado otro mutante de pérdida de función en fondo Landsberg *erecta* (*Ler*), distinto al usado en este estudio (fondo Col-0), lo cual podría dar lugar a comportamientos diferentes entre ambos (Lageix et al. 2008; Faus et al. 2015; Wang et al. 2016). Sin embargo, al analizar varias de las respuestas testadas a lo largo de este trabajo, en dicho mutante *gcn2^{Ler}* (fosforilación de eIF2 α , síntesis de proteínas en presencia de CHL y crecimiento bacteriano) hemos observado el mismo comportamiento que el exhibido por el mutante *gcn2* usado en este estudio (Fig. 21).

Nuestros resultados no permiten establecer una relación causa-efecto entre la fosforilación de eIF2 α y la inhibición global de la síntesis de proteínas en plantas, algo que sí ocurre en mamíferos o levaduras. En estos organismos, el complejo ternario eIF2-ARnt(Met)_i-GTP utiliza la hidrólisis de GTP a GDP como fuente de energía para la “acoplamiento” del ARnt(Met)_i sobre el codón de iniciación de cada mensajero. El complejo eIF2-GDP resultante es reciclado por el factor eIF2B a eIF2-GTP, de manera que pueda unirse a una nueva molécula de ARnt(Met)_i regenerando el complejo ternario eIF2-ARnt(Met)_i-GTP necesario para una nueva ronda de iniciación. La fosforilación de eIF2 α evita la disociación de eIF2B del complejo eIF2-GDP durante el reciclaje GDP/GTP, secuestrando eIF2 en su forma inactiva y evitando la formación de nuevo complejo ternario. En las plantas se han identificado los genes que codifican para las proteínas que forman eIF2B, sin embargo, no se ha aislado ningún factor con

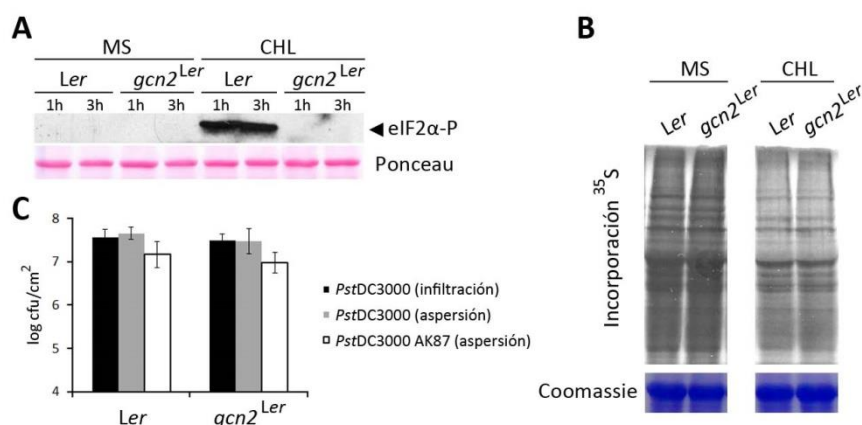


Figura 20 Respuestas de plantas silvestres (Ler) y mutantes gcn2^{Ler}. **(A)** Análisis de la fosforilación de eIF2α en plántulas de 7 días tratadas con clorosulfurón (CHL) o MS (control). Se extrajeron las proteínas a los tiempos indicados y se detectó la forma fosforilada del factor con anticuerpo específico anti-eIF2α-P. La tinción de rojo Ponceau (0,1 %) se usó como control de carga de las proteínas. **(B)** Síntesis de proteínas *de novo*. Las plántulas de 7 días fueron tratadas con CHL o MS por 2h y otras 2h con la mezcla ³⁵S (Met/Cys). Se muestra una autorradiografía representativa de las proteínas extraídas, usando la tinción de Coomassie como control de carga de las proteínas. **(C)** Crecimiento bacteriano de la cepa virulenta *PstDC3000*, inoculada por infiltración, y de la cepa *PstDC3000* AK87, inoculada por aspersión.

la misma actividad de reciclaje que los correspondientes a levaduras y mamíferos. Por otra parte, se ha descrito que la afinidad del factor eIF2 por GDP en las plantas de trigo (*Triticum aestivum*) es sólo 10 veces superior a su afinidad por GTP, mientras que por ejemplo, en el sistema de reticulocito de conejo, esta diferencia es de unas 100 veces (López et al. 2008; Shaikhin et al. 1992). Esto podría implicar que si la proporción GTP/GDP en el medio intracelular es suficientemente alta, el reciclaje eIF2-GDP/eIF2-GTP en las plantas podría producirse de forma espontánea minimizando el efecto regulatorio de eIF2α-P.

Además de las razones expuestas, cabe mencionar que existen dos genes (At2g40290 y At5g05470) que codifican isoformas el factor eIF2α en *Arabidopsis*. A pesar de ser muy similares, estas podrían diferir en su afinidad para actuar como sustratos de GCN2, o incluso que sus correspondientes formas fosforiladas no tengan la misma capacidad inhibidora de la síntesis de proteínas. De manera que, aunque *in vitro* se ha demostrado que ambas isoformas son fosforiladas por la quinasa GCN2 (Li et al. 2013), podrían existir factores *in vivo* que favorezcan la fosforilación de uno de las dos, dejando a la otra en su forma no fosforilada, y por lo tanto activa para iniciar la traducción.

Con independencia de estas posibilidades, la conservación funcional de GCN2 y su actividad en la modulación de la respuesta a los inhibidores de la síntesis de aminoácidos ensayados en este trabajo (CHL y PPT), así como a otros usados por diferentes autores (Lageix

et al. 2008; Faus et al. 2015) sostienen el papel de la fosforilación de eIF2 α en la adaptación a este tipo de estrés, aunque el mecanismo de respuesta no conllevaría la inhibición global de la síntesis de proteínas. En lugar de esto, eIF2 α -P podría modular la traducción de mensajeros específicos que sean especialmente sensibles a variaciones en los niveles del complejo ternario, como podrían ser los transcritos con uORFs en su estructura. A pesar de no existir un análogo a *GCN4* en plantas, alrededor del 35% de los mensajeros en *Arabidopsis* contienen al menos un uORF (la mitad de ellos más de uno). Estos genes están sobrerrepresentados en categorías funcionales regulatorias tales como factores de transcripción, quinasas y transportadores de la ruta de poliaminas (Von Arnim et al. 2014; Hayden & Jorgensen 2007). Varios de estos genes podrían ser diana de la regulación por GCN2 y eIF2 α y participar en la modulación de las respuestas adaptativas de las plantas.

5.2 La proteína NOXY7 actúa de forma coordinada con GCN20 durante la regulación de la traducción

Los resultados publicados recientemente por Wang et al., (2016) indicaban la participación de la proteína GCN1/NOXY7 de *Arabidopsis* en la adaptación al frío y que esta respuesta era independiente de GCN2, al no observarse diferencias significativas entre la respuesta del mutante *gcn2* y la de las plantas silvestres a este tipo de estrés. Nuestros resultados muestran repetidamente esta distinción entre *noxy7* y *gcn2*, a la vez que enfatizan las similitudes entre *noxy7* y *gcn20*, por una parte, y entre *gcn2* y las plantas silvestres, por otra. Todo ello sugiere que las proteínas NOXY7 y GCN20 actúan de forma coordinada en la regulación de la traducción en una ruta independiente de GCN2.

5.2.1 La respuesta a oxilipinas

El mutante *noxy7* fue aislado en un escrutinio genético dirigido a la identificación de plantas mutantes insensibles a la acción de la oxilipina 9-HOT y en particular a su actividad como inductora de un fenotipo de rizo radicular en plantas silvestres. Este fenotipo está asociado, además, a la activación de respuestas defensivas relacionadas con la modificación de la pared celular tales como la producción de callosa (Marcos et al. 2015). De acuerdo a lo esperado, resultados anteriores a este trabajo habían puesto de manifiesto que el mutante *noxy7* no activa el rizo radicular ni la deposición de callosa en respuesta a la presencia de 9-HOT. Además, y de acuerdo a la participación coordinada de las proteínas NOXY7 y GCN20 nuestros resultados mostraron que al igual que el mutante *noxy7*, las plántulas *gcn20* no activan un fenotipo de rizo radicular, ni acumulan callosa en respuesta a 9-HOT, mientras que ambas respuestas aparecen tanto en las plántulas silvestres como en el mutante *gcn2*. De esta

manera el mutante *gcn20* se comporta como un mutante *noxy*, y pone de manifiesto la participación del tándem NOXY7/GCN20 en la señalización del 9-HOT y, posiblemente, en la activación de la defensa vegetal. Esta función sería independiente de GCN2, idea que se ve apoyada además por los resultados que muestran que las oxilipinas derivadas de la actividad 9-LOX, tales como el 9-HOT y el 9-KOT, no inducen la fosforilación del factor eIF2 α .

Por otro lado, al examinar la respuesta de los mutantes *noxy7*, *gcn2* y *gcn20* a otras oxilipinas relacionadas con la respuesta de defensa tales como los derivados de la actividad 13-LOX, JA y OPDA, no se observaron diferencias con respecto a la respuesta de las plantas silvestres en cuanto al crecimiento de la raíz, a pesar de que ambas oxilipinas indujeron niveles moderados de fosforilación de eIF2 α en las plántulas silvestres. Estos resultados dejan abierta la posibilidad de que la proteína GCN2 pudiera participar en otros procesos regulados por la acción de los jasmonatos, tales como la respuesta a herida y a patógenos necrotrofos. Algunos indicios en este sentido han sido descritos por Lageix et al., (2008).

Finalmente, cabe resaltar que los mutantes *noxy7* y *gcn20* fueron insensibles también, a la presencia de ácido 9-oxo-nonanoico (9-Oxo). Esta oxilipina se produce tanto por oxidación enzimática por la acción de las 9-LOX, como de forma no enzimática (Wittek et al. 2014). En este sentido es importante mencionar que ambas formas de síntesis están relacionadas funcionalmente ya que tanto el 9-KOT como el 9-Oxo juegan un papel activo en la inducción de la defensa sistémica frente a la infección de *Pseudomonas* (Wittek et al. 2014; Vicente et al. 2012). De hecho, el alelo *ila-3*, presenta un defecto en la activación de la respuesta de defensa sistémica lo que podría estar relacionado con el defecto en la señalización de dichas oxilipinas.

5.2.2 La respuesta al daño mitocondrial

Las plantas silvestres reducen su tasa de traducción en una magnitud similar a *gcn2* frente al estrés mitocondrial producido por la antimicina A (alrededor del 50%), mientras que en los mutantes *noxy7* y *gcn20* esta disminución es menos acusada (~25-30%), lo cual estaría de acuerdo con el hecho de que estos mutantes son más sensibles al daño provocado por la antimicina A en comparación con *gcn2* y las plántulas silvestres. Estos resultados estarían indicando además, que la inhibición de la síntesis de proteínas en respuesta al daño mitocondrial formaría parte de los mecanismos de adaptación de la plantas frente a estas condiciones de estrés, y que las pérdidas de las funciones correspondientes a las proteínas NOXY7 y GCN20 dificultarían la adaptación. La antimicina A actúa provocando la inhibición del enzima Citocromo C reductasa de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y disminuyendo la eficiencia de la respiración celular (Li et al. 2014). Como consecuencia de esta

inhibición, se activa la ruta de señalización retrograda, en la que las mitocondrias, a través de señales, no definidas por el momento, establecen una comunicación con el núcleo dirigida a reprogramar el metabolismo (Ng et al. 2013; De Clercq et al. 2013). Dado que la síntesis de proteínas consume alrededor del 20-30% de la energía de la célula (Buttgereit, F; Brand 1995), la ralentización de este proceso podría facilitar la adaptación de las plantas a este tipo de estrés. En otros escenarios de baja respiración, tales como la hipoxia, la inhibición de la traducción en plantas contribuye, también, a facilitar la adaptación (Juntawong et al. 2014; Branco-Price et al. 2005).

5.2.3 La susceptibilidad al ácido bórico

El boro es un micronutriente esencial para las plantas, que existe en el suelo mayormente en forma de ácido bórico, y que contribuye al entrecruzamiento de las fibras de rhamnogalacturonano II (RGII) de la pared celular. Sin embargo, a concentraciones elevadas es tóxico para la mayoría de las células eucariotas. Si bien no se conocen exactamente las dianas que provocan la toxicidad del boro, se asume generalmente que estas (al igual que su actividad fisiológica) está relacionada con su afinidad para unirse a grupo dioles *cis*-vecinales presentes en moléculas como tales como azúcares y sus derivados (NAD, NTPs, S-adenosil metionina, etc) dando lugar a diésteres de borato (Fig. 22) (Bolaños et al. 2004; Goldbach & Wimmer 2007). A nivel de procesos celulares, múltiples estudios demuestran que el boro afecta especialmente la síntesis de proteínas. En levaduras, se ha demostrado que el exceso de boro activa la respuesta GAAC e inhibe la traducción (Ulusik, Kaya, Fomenko, et al. 2011). El escrutinio de mutantes afectados en la respuesta a boro en levaduras (Ulusik et al., 2011) permitió establecer que varios clones susceptibles a boro estaban afectados en el metabolismo de aminoácidos, mientras que todos los mutantes resistentes estaban afectados en genes involucrados en la modificación de la uridina en la base variable de los anticodones de ARNt. Estos mismos autores identificaron que varias de las proteínas que se inducen en respuesta al boro participarían en procesos de traducción como por ejemplo: lisil-ARNt sintetasa, la proteína ribosomal (RPL5) y el factor de elongación eEF3. En este sentido, cabe mencionar que la combinación de la región central de la proteína NOXY7 y la N-terminal de GCN20, se asemeja al factor fúngico eEF3. Por ello, y dado que ambos mutantes, *noxy7* y *gcn20* son hipersusceptibles al ácido bórico, y que las plantas no cuentan con un factor eEF3 propiamente dicho, cabe sugerir que el complejo NOXY7-GCN20 pudiera realizar una función similar a este en las plantas.

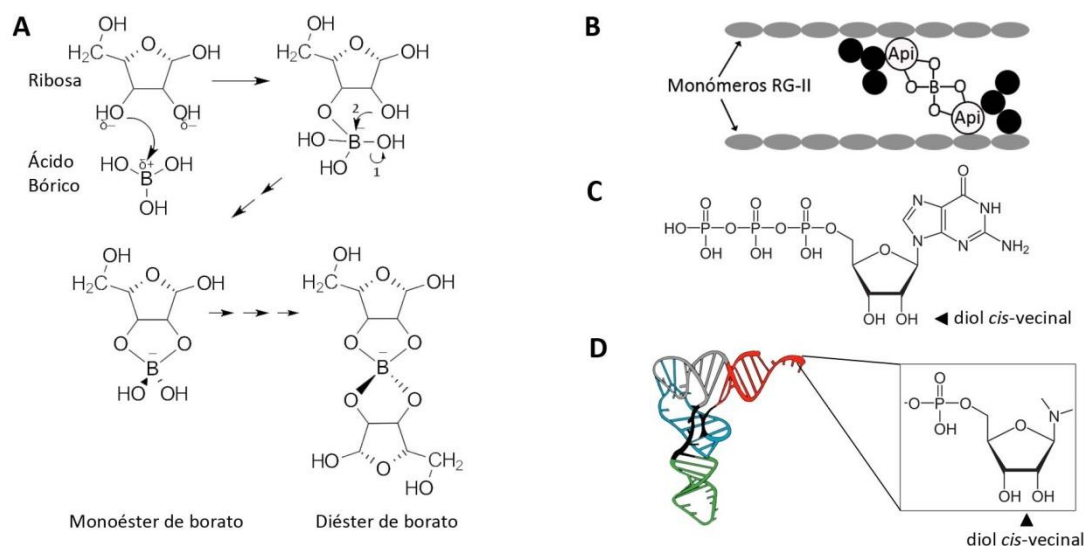


Figura 22. Posibles dianas de la acción del boro en la maquinaria traduccional. (A) Mecanismo de formación de diéster de borato por unión del ácido bórico a grupos dioles *cis*-vecinales (como por ejemplo en la molécula de ribosa). **(B)** La unión del boro a residuos de apiosa en la pared celular contribuye al entrecruzamiento de las fibras de rhamnogalacturonano II (RGII) en condiciones fisiológicas. **(C)** Unión del boro a moléculas portadoras de dioles *cis*-vecinales como el GTP. **(D)** Unión del boro en el extremo 3' del ARNt. En estas dos últimas interacciones, el boro afectaría a la maquinaria traduccional.

Nuestros resultados demuestran que *noxy7* y *gcn20* son hipersusceptibles al exceso de boro, mientras que el mutante *gcn2* exhibe una resistencia similar a la de las plántulas silvestres. Esta respuesta se correlaciona con la inhibición de la síntesis de proteínas en los cuatro genotipos: el ácido bórico provoca una ligera disminución de la síntesis en plántulas silvestres y en *gcn2*, mientras que esta respuesta es mucho más acusada en los mutantes *noxy76* y *gcn20*.

El estudio de la respuesta al ácido bórico en plantas ha revelado su actuación en la inducción de una parada en el desplazamiento de los ribosomas durante la traducción que aborta la reiniciación tras la presencia del uORF mínimo AUG-STOP. Esta parada facilita la degradación de los mensajeros correspondientes entre los que el transportador de ácido bórico NIP5 ha sido ampliamente caracterizado (Tanaka et al. 2011; Tanaka et al. 2016). El transportador de boro NIP5, al igual que otros genes de respuesta a boro contienen este tipo de uORF (AUG-STOP) en su 5'UTR para regular su expresión. Es plausible, por tanto, que en los mutantes *noxy7* y *gcn20* el boro aborte la reiniciación, o alguna fase de la elongación, de la traducción en un número de transcritos mayor que en las plantas silvestres, provocando una inhibición global de síntesis de proteínas más intensa. Las dianas de acción del boro podrían

ser los dioles *cis*-vecinales presentes en la maquinaria ribosomal, como son en los extremos 3' de los ARNt vacíos, el ARNr, o bien el ATP y el GTP consumidos durante el proceso (Fig. 22). Independientemente del mecanismo específico de actuación del boro, la hipersusceptibilidad de los mutantes *noxy7* y *gcn20* a este tratamiento pone de manifiesto el defecto de estos mutantes en la regulación de la traducción y por tanto, la participación de las proteínas NOXY7 y GCN20 en la regulación de este proceso.

5.2.4 La respuesta a la sequía

Los resultados de nuestros estudios sugieren que los genes *NOXY7* y *GCN20* actuarían de forma coordinada regulando la respuesta de las plantas a la sequía, y que este efecto se establecería a través de su participación en la ruta de señalización regulada por la acción del ABA. Así, nuestros demuestran que tanto a nivel del cierre estomático, como de la respuesta transcripcional o fenotípica a la presencia de ABA, ambos mutantes se comportan como hipersensibles. Es posible postular que los genes *NOXY7* y *GCN20* actuarían, por tanto, como reguladores negativos de la respuesta a ABA, aunque sería necesario estudiar si esta regulación se produce a través de la modulación de la síntesis de proteínas. Por otro lado, y dado el antagonismo que existe entre las rutas de ABA y la respuesta de defensa (Ton et al. 2009), es posible que la resistencia de *noxy7* y *gcn20* a la sequía, esté mecanísticamente relacionada con los resultados que demuestran la susceptibilidad de ambos mutantes a la infección de *Pseudomonas*.

5.2.5 La respuesta de defensa

Durante la respuesta a la infección de *Pseudomonas*, el mutante *gcn2* responde, una vez más, como las plantas silvestres lo que coincide con el hecho de que la infección con una variedad de cepas de este patógeno no induce la fosforilación de eIF2 α en plantas silvestres. A diferencia de estos resultados, los mutantes *noxy7* y *gcn20* son más susceptibles a la infección, aunque ambos mutantes difieren entre sí en esta respuesta. Así, mientras que ambas mutaciones impiden el cierre estomático en respuesta a la presencia de *Pseudomonas*, a nivel apoplástico el mutante *noxy7* es también más susceptible, mientras que las plantas *gcn20* responden igual que las plantas silvestres. El gen *NOXY7* tendría por tanto una función más generalizada que *GCN20* en la respuesta a estrés. NOXY7 es una proteína de gran tamaño formada por repeticiones HEAT en una estructura ARM que favorece la unión con otras proteínas o ácidos nucleicos. Uno de estos ligandos sería GCN20 que estaría controlando respuestas como el cierre estomático, la señalización del daño mitocondrial, la respuesta a ABA y la resistencia al boro. Otro de los ligandos con capacidad para unirse a NOXY7 sería

GCN2, que participaría en el control de la fosforilación de eIF2 α y otras respuestas relacionadas. En este contexto, es posible que existan además otros ligandos no identificados hasta ahora que podría estar participando en la regulación de la defensa apoplástica.

De acuerdo a esta idea, la mutación *gcn20* conlleva la pérdida de función de esta proteína y presenta un cuyo fenotipo similar al del mutante *noxy7* que a diferencia de *gcn20*, corresponde a un mutante de pérdida parcial de funcionalidad. De hecho, los mutantes alélicos de inserción *ila-1* e *ila-2* tienen fenotipos mucho más severos en cuanto su tamaño y viabilidad, además de mostrar un fenotipo de esterilidad (Monaghan & Li 2010). Por tanto, la proteína NOXY7 podría actuar como un nodo de regulación de las respuestas mediadas a través de GCN2 y GCN20, así como la de otros factores con los que estaría interaccionando para controlar procesos de defensa

5.3 NOXY7 regula la traducción a nivel global y específico durante la respuesta de defensa

Las variaciones detectadas en las respuestas del mutante *noxy7* con respecto a *gcn2* y a las plantas silvestres, están acompañadas de diferencias significativas en la tasa de síntesis de proteínas. En el caso de la respuesta a *Pseudomonas*, el aumento de la susceptibilidad del mutante *noxy7* es independiente de *gcn2* y podría estar también asociado a un defecto en regulación de la síntesis de proteínas. La dificultad técnica para evaluar la incorporación de ³⁵S-Met/Cys *in planta* durante la infección bacteriana, nos condujo a utilizar un método de infección *in vitro* (Ishiga et al. 2011) con el que procedimos a examinar la tasa de síntesis *de novo* de proteínas en plántulas silvestres y *noxy7* tras la inoculación de las bacterias *Pst* DC3000 y *Pst* DC3000 AK87. Estos ensayos pusieron de manifiesto que las plántulas silvestres sufrían una disminución generalizada de la síntesis de proteínas que estaba, a su vez, acompañada de la aparición de nuevas proteínas. Estos resultados sugerían que la activación de la respuesta inmune vegetal conlleva un proceso de regulación en el que se favorecería la traducción de determinados transcritos, a la vez que se produciría la inhibición de la traducción de muchos de ellos.

Estos ensayos no nos permitieron detectar diferencias significativas entre la respuesta de las plántulas silvestres y la del mutante *noxy7*, lo que podría indicar que el papel de la proteína NOXY7 en la inmunidad no estaría relacionado con la regulación global de la traducción, o que las condiciones de cultivo *in vitro* interfirieran con la expresión del fenotipo de *noxy7* ante una respuesta compleja y multifactorial como es la respuesta de defensa. De hecho, en estas condiciones no se observan algunas de las diferencias fenotípicas entre este

mutante y las plantas silvestres, algo que ya ha sido discutido por (Wang et al. 2016). Decidimos, por tanto, evaluar la acumulación de polisomas como método alternativo para examinar la tasa de traducción global durante la defensa *in vivo*, que permitía, además, estimar la eficiencia de traducción de transcritos específicos.

En estos ensayos pudimos comprobar en primer lugar, que la respuesta a *Pst*DC3000 y a *Pst*DC3000 AK87 de las plantas silvestres está acompañada de una reducción de la proporción de ARN presente en las fracciones polisómicas. Esta respuesta podría estar relacionada con la distribución de recursos que tiene lugar en la planta durante la activación de la inmunidad vegetal. De hecho, el crecimiento vegetativo y la activación de la defensa son dos respuestas antagónicas a múltiples niveles (Huot et al. 2014). Por ello., la reducción generalizada de síntesis de proteínas puede favorecer la distribución de energía y recursos de la planta para cubrir las necesidades asociadas a la inducción de los procesos de defensa.

Los resultados de estos análisis ponen de manifiesto que en condiciones basales, las plantas *noxy7* poseen una proporción menor de polisomas que las plantas silvestres, lo que podría estar relacionado con los fenotipos de crecimiento y amarilleamiento foliar que acompañan a este mutante. Además, y a diferencia de lo que ocurre en las plantas silvestres, la proporción de polisomas en el mutante *noxy7* no varía durante la respuesta a la infección, lo que estaría relacionado con el defecto de este mutante para activar la resistencia de la planta frente a la infección de *Pseudomonas*.

La respuesta inmune vegetal se caracteriza por la acumulación de altos niveles de proteínas de defensa, en particular de las denominadas proteínas PR. La acumulación de estas proteínas sería incongruente con la inhibición generalizada de la traducción, lo que sugiere que este proceso debe ir acompañado de la traducción selectiva de determinados transcritos que contribuirán a la protección de la planta y a evitar la infección. Nuestros resultados permiten apoyar esta propuesta ya que ponen de manifiesto que junto a la inhibición generalizada de la síntesis de proteínas, durante la respuesta de las plantas silvestres a la infección, se produce la activación específica de la traducción de mensajeros de defensa. Así, los genes *PR1*, *PR2*, *PR5* e *ICS1*, regulados por la acción del SA, aumentaron su eficiencia de traducción mientras que este parámetro se mantuvo constante en los genes constitutivos *ACT8* y *RBSC-1A*. La eficiencia de traducción se calcula de manera relativa a la población de polisomas. El hecho de que la eficiencia de traducción no varíe para estos genes, significa que la proporción de transcritos presente en la población polisomal se mantiene constante. Sin embargo, dado que el porcentaje de polisomas, en su conjunto, disminuye durante la infección, el resultado global es

que la síntesis de las proteínas ACT8 y RBSC-1A disminuiría. A diferencia de estos resultados, el aumento de la eficiencia de la traducción de los genes de defensa compensa la bajada global de polisomas, de manera que la producción de estas proteínas no se encuentra afectada por la reducción generalizada de la traducción.

Estos resultados revelan una elegante estrategia vegetal para garantizar los recursos necesarios para la defensa de la plantas sin afectar la síntesis de las proteínas específicas requeridas. Sin embargo no podemos asegurar en este punto si, mecanísticamente, la dicotomía entre los transcritos de defensa y los constitutivos se debe a una inhibición global de la traducción compensada con la activación de mensajeros específicos de defensa. Alternativamente (o adicionalmente), podría existir una represión selectiva de la traducción de mensajeros constitutivos de alta expresión que produzca una reducción de la población polisómica, causando un aumento aparente en la eficiencia de traducción de los mensajeros de defensa. Para examinar este proceso en mayor detalle y determinar qué factores permiten discriminar entre ambas clases de mensajeros nos proponemos realizar un estudio global del traductoma durante la defensa de la planta.

Los resultados obtenidos con el estudios de las plantas *noxy7* revelan la incapacidad de este mutante para potenciar la traducción de los mensajeros de defensa analizados. De hecho, la eficiencia de traducción de los mismos, durante las infecciones, disminuye respecto a las determinadas en condiciones basales. Es significativo que la disminución observada es más acusada en la infección con la cepa virulenta (*Pst*DC3000) lo que podría sugerir que la interferencia en la síntesis de proteínas a este nivel pudiera representar un nuevo mecanismo de patogenicidad de la bacteria *Pseudomonas*. El patrón observado en los genes constitutivos analizados en la infección del mutante *noxy7* es menos claro. Así, mientras que la eficiencia de la traducción del gen *ACT8* sigue el mismo comportamiento que la de los genes de defensa, la traducción del gen *RBSC1-A* aumenta durante la infección con *Pst* DC3000, sugiriendo que la interferencia del patógeno en la traducción sería dependiente de la naturaleza del mensajero. En este caso, y al igual que mencionamos anteriormente, la identificación de las secuencias implicadas en la regulación de la traducción de estos requerirá el estudio global del traductoma. En cualquier caso, los datos obtenidos en este trabajo permiten concluir que en respuesta a la infección de *Pseudomonas*, las plantas silvestres traducen el ARNm de manera diferencial para potenciar la defensa, en un proceso que dependiente de NOXY7.

5.4 La composición ribosomal en la regulación de la defensa

La síntesis de proteínas es sin duda un proceso determinante para la supervivencia de cualquier organismo debido, entre otros factores, a que afecta al resto de las funciones celulares y al gasto energético que conlleva. Como motor molecular en el centro de este proceso, los ribosomas han sido modelados cuidadosamente a lo largo de la evolución de manera se han ido añadiendo capas concéntricas en forma de nuevas proteínas y extensiones de ARNr a medida que los ribosomas corresponden a organismos más complejos como por ejemplo las plantas y los mamíferos (Anger et al. 2013). Así, la biogénesis de los ribosomas es un proceso cuidadosamente regulado con múltiples puntos de control, en los que las proteínas ribosomales tienen un papel fundamental. De hecho, en tejidos en rápido crecimiento, este proceso puede consumir más de la mitad de la energía de la célula (Browning & Bailey-Serres 2015). Las proteínas ribosomales pueden tener, además, funciones extrarribosomales de carácter regulatorio (Horiguchi et al. 2012) o participar en procesos como la inducción de la muerte celular frente a condiciones de estrés (Cui et al. 2014).

Al analizar los perfiles ribosomales en *Arabidopsis* pudimos comprobar que la proporción de subunidades ribosomales libres respecto a las más activas (polisomas) era inusualmente alta en relación a los valores determinados en levaduras o mamíferos (Saini et al. 2009; Morello et al. 2011), y similar a la observada en otros estudios con *Arabidopsis* (Echevarría-Zomeño et al. 2013). La comparación de las familias de proteínas ribosomales (familias RP) de estos tres reinos, puso de manifiesto que el número de proteínas que integran cada una de las familias es significativamente superior en plantas, de forma que al calcular en número de ribosomas diferentes que podrían conformarse con ellas, es de unos $5,8 \times 10^{30}$ en *Arabidopsis*, frente a unos 13.000 en mamíferos o unos $2,7 \times 10^{11}$ en levaduras. Esta diferencia se amplifica si consideramos, además, que la diversidad estructural de familias RP de *Arabidopsis* es mayor que las de humanos o levaduras, lo que podría generar ribosomas más diversos, que podrían tener, a su vez, distintas especificidades.

En la última década, los avances en la generación y procesamiento de grandes cantidades de datos transcriptómicos han facilitado la comprensión de los procesos fisiológicos, llevándonos a considerar que, como regla general, los genes actúan en relación a su tasa de transcripción. Sin embargo, el análisis de los niveles de transcritos presentes en las fracciones polisomales y especialmente la técnica de huella ribosomal en los mensajeros (*ribosomal footprinting*) revelan que en muchos casos, no existe una relación directa entre los niveles transcritos libres y los niveles de traducción de los mismos (Juntawong et al. 2014). La idea de

que la composición ribosomal pueda influir en la traducción selectiva de transcritos ha sido propuesta en diversas ocasiones, en lo que ha dado en llamarse la “hipótesis del filtro ribosomal” (Mauro & Edelman 2002; Mauro & Edelman 2007; Horiguchi et al. 2012). Así, por ejemplo en levaduras, donde una proporción considerable de familias RP tiene únicamente dos miembros, se ha descrito que la traducción del gen *ASYMMETRIC SYNTHESIS OF HO 1* requiere la presencia de las proteínas ribosomales RPL7A, RPL12B, RPL22A y RPS18B, mientras que sus los parálogos de éstas, RPL7B, RPL12A, RPL22B y RPS18A son prescindibles o tienen un papel muy minoritario (Horiguchi et al. 2012; Komili et al. 2007). Por otra parte, se ha demostrado que los ribosomas en fase estacionaria de cultivo son deficitarios en proteínas ribosomales ácidas (P1 y P2) en comparación con las células que se encuentran fase exponencial de crecimiento, y que ambos tipos de ribosomas traducen distintos ARNm de manera diferencial (Mauro & Edelman 2002).

En *Arabidopsis*, la transcripción diferencial de varios genes de proteína sribosomales está regulada por condiciones ambientales como la disponibilidad de carbono, fósforo y metales (Hummel et al. 2012; Wang et al. 2013; Browning & Bailey-Serres 2015) así como en diferentes tipos celulares (Mustroph et al. 2009). Nuestros resultados sugieren que este tipo de regulación podría tener un peso mayor en *Arabidopsis* debido a la alta heterogeneidad de los genes *RP*. Esto sería relevante en la respuesta de defensa, en la que hemos encontrado que una proporción considerable de familias RP tiene miembros cuyos patrones de expresión divergen entre sí. Además, esta divergencia es estadísticamente más notable en familias cuyos miembros son más distintos a nivel de secuencia revelando una tendencia evolutiva. Tal es el caso, por ejemplo, de las familias L2 y L30e, ya que el análisis de plantas mutantes en varios de sus genes miembros muestra variaciones en el nivel de resistencia a *Pst*DC3000 respecto a las plantas silvestres. Las proteínas L2 y L30e, y otras con alta divergencia de expresión y secuencia como L3 y L43e, se encuentran formando parte (o muy próximas) a puentes de contacto entre las dos subunidades ribosomales (Tibshirani et al. 2011), sugiriendo que la afinidad entre ambas subunidades puede ser una de las formas de regulación de la eficiencia de la traducción durante la respuesta de defensa.

Las RP son en su mayoría proteínas básicas con una elevada afinidad por el ARN, de ahí que se unan al ARNr para formar los ribosomas. De acuerdo a la hipótesis del filtro ribosomal (Mauro & Edelman 2002; Mauro & Edelman 2007), esta característica podría determinar la afinidad de estas proteínas por el ARNm, facilitando su reclutamiento y su traducción. En este trabajo, hemos encontrado que tras la infección con *Pseudomonas* una la traducción de los transcritos de defensa (*PR1*, *PR2*, *PR5*, *ICS1*) se favorece en comparación con la de los genes

constitutivos *ACT8* y *RBSC-1A* lo que podría depender de la composición de los ribosomas en esa condición.

En su conjunto, nuestros resultados sugieren que las plantas exhiben singularidades en la regulación de la traducción durante la respuesta inmune, tanto a través de la actividad no canónica de las proteínas NOXY7/GCN1-GCN20, como de la posible variación en la composición de los ribosomas durante la defensa. Recientemente, se ha identificado la proteína S10e como un receptor de unión a GCN1 en levaduras (Lee et al. 2015). Las levaduras tienen dos isoformas de S10e. Según ese estudio, ambas son capaces de unir GCN1 y la falta de cualquiera de las dos atenúa la fosforilación de eIF2 α sugiriendo que participan en el anclaje al ribosoma del complejo GCN1-GCN20-GCN2. En *Arabidopsis*, sin embargo, la familia S10e tiene tres miembros con una identidad promedio del 84% (Tabla S1) (llegando a ser del 78% entre las isoformas S10e-2 y S10e-3), lo cual es inferior a la media en *Arabidopsis* y muy inferior a la identidad entre las dos isoformas presentes en levaduras (97%). Es probable, por tanto, que la adquisición de funciones específicas por NOXY7/GCN1 en la regulación de la traducción de los genes de defensa esté relacionada con la unión preferente a alguna de las isoformas de S10e. Dado el gran tamaño de la proteína NOXY7/GCN1 (2610 aa) y la elevada proporción de su secuencia que estaría en contacto con el ribosoma (Sattlegger & Hinnebusch 2000), es poco probable que las isoformas S10e (~180 aa) sean su único ligando ribosomal, por lo que otras familias de proteínas ribosomales podrían regular la acción de GCN1/NOXY7 durante la respuesta de defensa.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

- 1- Las proteínas NOXY7 y GCN2, pero no GCN20, participan en la fosforilación del factor eIF2 α durante la respuesta de las plantas frente a las condiciones de estrés provocadas por la escasez de aminoácidos, el estrés del retículo endoplásmico, el estrés mitocondrial y el exceso de boro.
- 2- Las proteínas NOXY7 y GCN2 participan en la adaptación de las plantas a las escasez de aminoácidos.
- 3- La fosforilación del factor eIF2 α no conlleva la inhibición generalizada de la síntesis de proteínas en las condiciones de estrés mencionadas.
- 4- Las proteínas NOXY7 y GCN20 modulan la síntesis global de proteínas y la adaptación de las plantas en respuesta al estrés mitocondrial y al exceso de boro, en un proceso independiente de GCN2 y eIF2 α -P.
- 5- Las proteínas NOXY7 y GCN20 regulan la respuesta a oxilipinas tales como el ácido 9-oxo-nonanoico y los ácidos 9-HOT y 9-KOT, a través de una ruta de señalización, independiente de GCN2 y eIF2 α -P.
- 6- Las proteínas NOXY7 y GCN20 actúan como reguladores negativos de la señalización de ABA durante la respuesta al estrés hídrico, en un proceso independiente de GCN2 y eIF2 α -P.
- 7- La respuesta de defensa que se activa frente a la infección de *P. syringae* no está acompañada de la activación de GCN2 ni de la formación de eIF2 α -P.
- 8- La proteína NOXY7 controla la respuesta de defensa de la planta frente a la bacteria *P. syringae* regulando la abundancia de polisomas, y favoreciendo la traducción de mensajeros específicos de defensa.
- 9- Las plantas de *Arabidopsis* tienen una mayor diversidad de proteínas ribosomales que otros organismos modelo, tales como levaduras y humanos, que influye en la activación de la defensa vegetal.

Material Suplementario

Tabla S1. Variabilidad de secuencia y expresión en condiciones de defensa de las familias de proteínas ribosomales en *Arabidopsis*.

| Familia | Secuencia | | | Expresión | | |
|---------|----------------------|-----------------------------|------------------|-----------|-------|---------------|
| Nombre | Identidad (Id, %) | Variabilidad (100-Id, %) | $\log_2(100-Id)$ | V_{int} | V_0 | $V_{int}-V_0$ |
| L1 | 93,21 | 6,79 | 2,76 | 3,41 | 5,30 | -1,89 |
| L2 | 90,82 | 9,18 | 3,20 | 4,74 | 3,35 | 1,39 |
| L3 | 86,38 | 13,62 | 3,77 | 6,89 | 5,89 | 1,00 |
| L4 | 95,32 | 4,68 | 2,23 | 2,05 | 4,63 | -2,57 |
| L5 | 99,45 | 0,55 | -0,86 | 4,91 | 5,96 | -1,04 |
| L6 | 88,54 | 11,46 | 3,52 | 5,67 | 5,44 | 0,23 |
| L6e | 93,56 | 6,44 | 2,69 | 5,59 | 5,00 | 0,59 |
| L8e | 96,09 | 3,91 | 1,97 | 3,38 | 5,11 | -1,73 |
| L10 | 86,77 | 13,23 | 3,73 | 5,85 | 5,64 | 0,21 |
| L11 | 94,98 | 5,02 | 2,33 | 4,73 | 6,08 | -1,36 |
| L13 | 91,67 | 8,33 | 3,06 | 4,34 | 5,48 | -1,15 |
| L13e | 84,46 | 15,54 | 3,96 | 4,91 | 4,18 | 0,73 |
| L14e | 93,28 | 6,72 | 2,75 | 4,91 | 4,78 | 0,13 |
| L15 | 85,56 | 14,44 | 3,85 | 4,46 | 3,14 | 1,32 |
| L15e | 99,51 | 0,49 | -1,03 | 3,06 | 5,24 | -2,18 |
| L16 | 95,61 | 4,39 | 2,13 | 6,75 | 6,07 | 0,68 |
| L18 | 97,67 | 2,33 | 1,22 | 2,53 | 5,62 | -3,09 |
| L18e | 85,56 | 14,44 | 3,85 | 4,59 | 4,29 | 0,29 |
| L19e | 87,92 | 12,08 | 3,59 | 5,08 | 5,01 | 0,07 |
| L20e | 92,61 | 7,39 | 2,89 | 3,86 | 4,57 | -0,71 |
| L21e | 97,56 | 2,44 | 1,29 | 3,74 | 5,17 | -1,43 |
| L22 | 97,14 | 2,86 | 1,52 | 4,18 | 5,59 | -1,40 |
| L22e | 79,84 | 20,16 | 4,33 | 4,22 | 3,76 | 0,45 |
| L23 | 94,81 | 5,19 | 2,38 | 3,88 | 6,31 | -2,43 |
| L24 | 85,62 | 14,38 | 3,85 | 5,80 | 5,59 | 0,21 |
| L24e | 52,61 | 47,39 | 5,57 | 5,15 | 5,73 | -0,58 |
| L27e | 87,4 | 12,6 | 3,66 | 4,95 | 6,42 | -1,47 |
| L28e | 90,21 | 9,79 | 3,29 | 3,30 | 5,40 | -2,11 |
| L29 | 95,26 | 4,74 | 2,24 | 4,90 | 5,40 | -0,50 |
| L29e | 95,08 | 4,92 | 2,30 | 6,31 | 8,16 | -1,85 |
| L30 | 66,5 | 33,5 | 5,07 | 5,29 | 5,52 | -0,23 |
| L30e | 94,64 | 5,36 | 2,42 | 4,66 | 4,18 | 0,48 |
| L31e | 94,4 | 5,6 | 2,49 | 4,13 | 5,39 | -1,26 |
| L33e | 95,2 | 4,8 | 2,26 | 5,83 | 6,27 | -0,44 |
| L34e | 94,98 | 5,02 | 2,33 | 4,90 | 5,64 | -0,74 |
| L36e | 89,62 | 10,38 | 3,38 | 5,25 | 5,58 | -0,33 |
| L37e | 94,03 | 5,97 | 2,58 | 3,96 | 5,57 | -1,61 |
| L39e | 96,08 | 3,92 | 1,97 | 5,06 | 6,02 | -0,96 |
| L43e | 90,22 | 9,78 | 3,29 | 5,55 | 3,44 | 2,11 |
| P1 | 74,05 | 25,95 | 4,70 | 4,35 | 4,59 | -0,24 |
| P2 | 63,56 | 36,44 | 5,19 | 5,79 | 5,16 | 0,62 |

Tabla S1 (continuación)

| Familia | Secuencia | | | Expresión | | |
|--------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------|----------------|----------------------------------|
| Nombre | Identidad (Id, %) | Variabilidad (100-Id, %) | log ₂ (100-Id) | V _{int} | V ₀ | V _{int} -V ₀ |
| RACK1 | 89,36 | 10,64 | 3,41 | 5,37 | 7,51 | -2,14 |
| S1e | 94,27 | 5,73 | 2,52 | 5,18 | 5,49 | -0,31 |
| S2 | 84,23 | 15,77 | 3,98 | 6,45 | 5,79 | 0,67 |
| S3 | 90,6 | 9,4 | 3,23 | 4,53 | 4,62 | -0,09 |
| S4 | 86,8 | 13,2 | 3,72 | 6,38 | 5,46 | 0,91 |
| S4e | 99,23 | 0,77 | -0,38 | 4,13 | 5,64 | -1,51 |
| S5 | 89,3 | 10,7 | 3,42 | 5,40 | 5,67 | -0,27 |
| S6e | 94,38 | 5,62 | 2,49 | 4,54 | 5,25 | -0,71 |
| S7e | 81,97 | 18,03 | 4,17 | 3,83 | 5,25 | -1,42 |
| S8 | 67,9 | 32,1 | 5,00 | 5,15 | 4,44 | 0,72 |
| S8e | 85,58 | 14,42 | 3,85 | 4,46 | 3,82 | 0,64 |
| S9 | 92,24 | 7,76 | 2,96 | 5,44 | 4,30 | 1,14 |
| S10 | 96,72 | 3,28 | 1,71 | 4,17 | 5,21 | -1,04 |
| S10e | 84,35 | 15,65 | 3,97 | 3,67 | 5,07 | -1,40 |
| S11 | 97,56 | 2,44 | 1,29 | 3,21 | 4,97 | -1,76 |
| S12e | 84,03 | 15,97 | 4,00 | 4,32 | 5,71 | -1,39 |
| S15 | 99,34 | 0,66 | -0,60 | 3,75 | 5,11 | -1,36 |
| S17 | 93,5 | 6,5 | 2,70 | 6,19 | 6,97 | -0,79 |
| S17e | 94,94 | 5,06 | 2,34 | 4,44 | 6,17 | -1,73 |
| S19 | 80,83 | 19,17 | 4,26 | 3,99 | 2,75 | 1,24 |
| S19e | 93,46 | 6,54 | 2,71 | 4,88 | 5,17 | -0,28 |
| S21e | 93,9 | 6,1 | 2,61 | 4,66 | 4,56 | 0,10 |
| S24e | 95,49 | 4,51 | 2,17 | 3,37 | 4,94 | -1,57 |
| S25e | 92,75 | 7,25 | 2,86 | 4,70 | 4,43 | 0,27 |
| S26e | 97,44 | 2,56 | 1,36 | 3,77 | 5,70 | -1,93 |
| S27e | 87,57 | 12,43 | 3,64 | 3,59 | 5,15 | -1,56 |
| S28e | 96,88 | 3,12 | 1,64 | 3,11 | 4,86 | -1,74 |
| S31e | 93,6 | 6,4 | 2,68 | 4,92 | 4,59 | 0,32 |

Bibliografia

Referencias Bibliográficas

- Abastado, Jean-pierre, Paul F Miller, Belinda M Jackson, and Alan G Hinnebusch. 1991. "Suppression of Ribosomal Reinitiation at Upstream Open Reading Frames in Amino Acid-Starved Cells Forms the Basis for GCN4 Translational Control." *Molecular and Cellular Biology* 11 (1): 486–96.
- Alonso, José M, Anna N Stepanova, Thomas J Leisse, Christopher J Kim, Huaming Chen, Paul Shinn, Denise K Stevenson, et al. 2003. "Genome-Wide Insertional Mutagenesis of Arabidopsis Thaliana." *Science* 301 (5633): 653 LP-657.
- Anderson, Jonathan P, Ellet Badruzaufari, Peer M Schenk, John M Manners, Olivia J Desmond, Christina Ehler, Donald J Maclean, Paul R Ebert, and Kemal Kazan. 2004. "Antagonistic Interaction between Absciscic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in Arabidopsis." *The Plant Cell* 16 (12): 3460–79. doi:10.1105/tpc.104.025833.
- Andrew, P Kloek, L Verbsky Michelle, B Sharma Shashi, E Schoelz James, Vogel John, F Klessig Daniel, and N Kunkel Barbara. 2001. "Resistance to *Pseudomonas Syringae* Conferred by an *Arabidopsis Thaliana* Coronatine-Insensitive (*coi1*) Mutation Occurs through Two Distinct Mechanisms." *The Plant Journal* 26: 509–22. doi:10.1046/j.1365-313X.2001.01050.x.
- Anger, A M, J P Armache, O Berninghausen, M Habeck, M Subklewe, D N Wilson, and R Beckmann. 2013. "Structures of the Human and Drosophila 80S Ribosome." *Nature* 497 (7447): 80–85. doi:10.1038/nature12104.
- Asai, Shuta, Kohji Ohta, and Hirofumi Yoshioka. 2008. "MAPK Signaling Regulates Nitric Oxide and NADPH Oxidase-Dependent Oxidative Bursts in Nicotiana Benthiana." *The Plant Cell* 20 (5): 1390–1406. doi:10.1105/tpc.107.055855.
- Bakker, Peter A H M, Corné M J Pieterse, and L C Van Loon. 2007. "Induced Systemic Resistance by Fluorescent Pseudomonas Spp ." *Phytopathology* 97: 239–43.
- Bannenberg, Gerard, Marta Martinez, Mats Hamberg, and Carmen Castresana. 2009. "Diversity of the Enzymatic Activity in the Lipxygenase Gene Family of Arabidopsis Thaliana." *Lipids* 44: 85–95. doi:10.1007/s11745-008-3245-7.
- Barakat, A, K Szick-Miranda, I F Chang, R Guyot, G Blanc, R Cooke, M Delseny, and J Bailey-Serres. 2001. "The Organization of Cytoplasmic Ribosomal Protein Genes in the Arabidopsis Genome." *Plant Physiology* 127 (2): 398–415. doi:10.1104/pp.010265.398.
- Bell, Erin, Robert A Creelman, and John E Mullet. 1995. "A Chloroplast Lipxygenase Is Required for Wound-Induced Jasmonic Acid Accumulation in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (September): 8675–79.
- Bernier, François, and Anne Berna. 2001. "Germins and Germin-like Proteins : Plant Do-All Proteins ." *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 545–54.
- Bernoux, Maud, Ton Timmers, Alain Jauneau, Christian Brie, and Laurent Deslandes. 2008. "RD19 , an Arabidopsis Cysteine Protease Required for RRS1-R – Mediated Resistance , Is Relocalized to the Nucleus by the Ralstonia Solanacearum PopP2 Effector." *The Plant Cell* 20: 2252–64. doi:10.1105/tpc.108.058685.
- Berrocal-Lobo, Marta, Antonio Molina, and Roberto Solano. 2002. "Constitutive Expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis Confers Resistance to Several Necrotrophic Fungi." *The Plant Journal* 29 (1). Blackwell Science, Ltd: 23–32. doi:10.1046/j.1365-313x.2002.01191.x.

- Blée, Elizabeth. 1998. "Synthese Pflanzlicher Lipide Und Ihre Regulation / Plant Lipid Synthesis and Regulation Biosynthesis of Phytooxylipins : The Peroxygenase Pathway." *Lipid* 100: 121–27.
- Bleecker, Anthony B, and Hans Kende. 2000. "Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16 (1). Annual Reviews: 1–18. doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.1.
- Boatwright, J O N Lucas, and Karolina Pajerowska-mukhtar. 2013. "Salicylic Acid : An Old Hormone up to New Tricks." *Molecular Plant Pathology* 14: 623–34. doi:10.1111/mpp.12035.
- Bolaños, Luis, Krystyna Lukaszewski, Ildefonso Bonilla, and Dale Blevins. 2004. "Why Boron?" *Plant Physiology and Biochemistry* 42 (11): 907–12. doi:10.1016/j.plaphy.2004.11.002.
- Branco-Price, Cristina, Riki Kawaguchi, Ricardo B. Ferreira, and Julia Bailey-Serres. 2005. "Genome-Wide Analysis of Transcript Abundance and Translation in Arabidopsis Seedlings Subjected to Oxygen Deprivation." *Annals of Botany* 96 (4): 647–60. doi:10.1093/aob/mci217.
- Brien, Jose A O, Arsalan Daudi, Vernon S Butt, and G Paul Bolwell. 2012. "Reactive Oxygen Species and Their Role in Plant Defence and Cell Wall Metabolism." *Planta* 236: 765–79. doi:10.1007/s00425-012-1696-9.
- Brooks, David M, Carol L Blender, and Barbara N Kunkel. 2005. "The Pseudomonas Syringae Phytotoxin Coronatine Promotes Virulence by Overcoming Salicylic Acid-Dependent Defences in Arabidopsis Thaliana." *Molecular Plant Pathology* 6: 629–39. doi:10.1111/J.1364-3703.2005.00311.X.
- Browning, Karen S., and Julia Bailey-Serres. 2015. "Mechanism of Cytoplasmic mRNA Translation." *The Arabidopsis Book* 13: e0176. doi:10.1199/tab.0176.
- Burch-smith, Tessa M, Michael Schiff, Jeffrey L Caplan, Jeffrey Tsao, Kirk Czymmek, and Savithramma P Dinesh-kumar. 2007. "A Novel Role for the TIR Domain in Association with Pathogen-Derived Elicitors." *Plos Biology* 5 (3). doi:10.1371/journal.pbio.0050068.
- Buttgereit, F; Brand, M D. 1995. "A Hierarchy of ATP-Consuming Processes in Mammalian Cells." *The Biochemical Journal* 312 (Pt 1: 163–67. doi:10.1210/er.2008-0019.
- Castilho, Beatriz A., Renuka Shanmugam, Richard C. Silva, Rashmi Ramesh, Benjamin M. Himme, and Evelyn Sattlegger. 2014. "Keeping the eIF2 Alpha Kinase Gcn2 in Check." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1843 (9). Elsevier B.V.: 1948–68. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.04.006.
- Chater, Caspar, and Julie E. Gray. 2015. "Stomatal Closure: The Old Guard Takes up the SLAC." *Current Biology* 25 (7). Elsevier Ltd: R271–73. doi:10.1016/j.cub.2015.01.032.
- Chinchilla, Delphine, Zsuzsa Bauer, Martin Regenass, Thomas Boller, and Georg Felix. 2006. "The Arabidopsis Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception." *The Plant Cell* 18 (February): 465–76. doi:10.1105/tpc.105.036574.1.
- Chinchilla, Delphine, Cyril Zipfel, Silke Robatzek, Birgit Kemmerling, Thorsten Nürnberger, Jonathan D G Jones, Georg Felix, and Thomas Boller. 2007. "A Flagellin-Induced Complex of the Receptor FLS2 and BAK1 Initiates Plant Defence." *Nature* 448 (7152): 497–500. doi:10.1038/nature05999.
- Chini, Andrea, Marta Boter, and Roberto Solano. 2009. "Plant Oxylinipins : COI1 / JAZs / MYC2 as the Core Jasmonic Acid-Signalling Module." *FEBS Journal* 276 (Table 1): 4682–92. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07194.x.

- Chisholm, Stephen T, Gitta Coaker, Brad Day, and Brian J Staskawicz. 2006. "Review Host-Microbe Interactions : Shaping the Evolution of the Plant Immune Response." *Cell* 124: 803–14. doi:10.1016/j.cell.2006.02.008.
- Creelman, Robert A., and John E. Mullet. 1997. "Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 355–81. doi:10.1146/annurev.arplant.48.1.355.
- Cui, D, L Li, H Lou, H Sun, S-M Ngai, G Shao, and J Tang. 2014. "The Ribosomal Protein S26 Regulates p53 Activity in Response to DNA Damage." *Oncogene* 33 (17): 2225–35. doi:10.1038/onc.2013.170.
- Dangl, Jeffery L, and Jonathan D G Jones. 2001. "Plant Pathogens and Integrated Defence Responses to Infection." *Nature* 411 (June).
- De Clercq, Inge, Vanessa Vermeirssen, Olivier Van Aken, Klaas Vandepoele, Monika W Murcha, Simon R Law, Annelies Inzé, et al. 2013. "The Membrane-Bound NAC Transcription Factor ANAC013 Functions in Mitochondrial Retrograde Regulation of the Oxidative Stress Response in Arabidopsis." *The Plant Cell* 25 (9): 3472–90. doi:10.1105/tpc.113.117168.
- De León, Inés Ponce, Ana Sanz, Mats Hamberg, and Carmen Castresana. 2002. "Involvement of the Arabidopsis Alpha-DOX1 Fatty Acid Dioxygenase in Protection against Oxidative Stress and Cell Death." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 29 (1): 61–62. doi:1195 [pii].
- Dean, Ralph, Jan A L Van Kan, Zacharias A. Pretorius, Kim E. Hammond-Kosack, Antonio Di Pietro, Pietro D. Spanu, Jason J. Rudd, et al. 2012. "The Top 10 Fungal Pathogens in Molecular Plant Pathology." *Molecular Plant Pathology* 13 (4): 414–30. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.
- Debener, T, H Lehnackers, M Arnold, and J L Dangl. 1991. "Identification and Molecular Mapping of a Single Arabidopsis Thaliana Locus Determining Resistance to a Phytopathogenic Pseudomonas Syringae Isolate." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 1 (3): 289–302. doi:10.1046/j.1365-313X.1991.t01-7-00999.x.
- Dellaporta, Stephen L, Jonathan Wood, and James B Hicks. 1983. "A Plant DNA Miniprep: Version II." *Plant Molecular Biology Reporter* 1 (4). Springer: 19–21.
- Després, Charles, Catherine Delong, Sarah Glaze, Enwu Liu, and Pierre R Fobert. 2000. "The Arabidopsis NPR1 / NIM1 Protein Enhances the DNA Binding Activity of a Subgroup of the TGA Family of bZIP Transcription Factors." *The Plant Cell* 12 (February): 279–90.
- Dever, Thomas E., Lan Feng, Ronald C. Wek, A. Mark Cigan, Thomas F. Donahue, and Alan G. Hinnebusch. 1992. "Phosphorylation of Initiation Factor ??? By Protein Kinase GCN2 Mediates Gene-Specific Translational Control of GCN4 in Yeast." *Cell* 68 (3): 585–96. doi:10.1016/0092-8674(92)90193-G.
- Dinkova-Kostova, Albena T., W. David Holtzclaw, and Thomas W. Kensler. 2005. "The Role of Keap1 in Cellular Protective Responses." *Chemical Research in Toxicology* 18 (12): 1779–91. doi:10.1021/tx050217c.
- Dodds, Peter N, and John P Rathjen. 2010. "Plant Immunity: Towards an Integrated View of Plant–pathogen Interactions." *Nature Reviews* 11 (8). Nature Publishing Group: 539–48. doi:10.1038/nrg2812.
- Dubiella, Ullrich, Heike Seybold, Guido Durian, Eileen Komander, Roman Lassig, Claus-Peter Witte, Waltraud X Schulze, and Tina Romeis. 2013. "Calcium-Dependent Protein kinase/NADPH Oxidase Activation Circuit Is Required for Rapid Defense Signal Propagation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (21): 8744–49. doi:10.1073/pnas.1221294110.

- Dunaevskii, Ya E, T A Tsybina, G A Belyakova, V I Domash, T P Sharpio, S A Zabreiko, and M A Belozerskii. 2005. "Proteinase Inhibitors as Antistress Proteins in Higher Plants." *Applied Biochemistry and Microbiology* 41 (4): 392–96.
- Echevarría-Zomeño, Sira, Emilio Yáñez, Nuria Fernández-Bautista, Ana B. Castro-Sanz, Alejandro Ferrando, and M. Mar Castellano. 2013. "Regulation of Translation Initiation under Biotic and Abiotic Stresses." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (3): 4670–83. doi:10.3390/ijms14034670.
- Eggle, Aimee L, Guowen Liu, John M Pezzuto, Richard B van Breemen, and Andrew D Mesecar. 2005. "Modifying Specific Cysteines of the Electrophile-Sensing Human Keap1 Protein Is Insufficient to Disrupt Binding to the Nrf2 Domain Neh2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (29): 10070–75. doi:10.1073/pnas.0502402102.
- Fang, Ferric C, and William Hazlett. 2004. "ANTIMICROBIAL REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES ." *Nature Reviews. Microbiology* 2 (October): 820–32. doi:10.1038/nrmicro1004.
- Faus, Isabel, Ana Zabalza, Julia Santiago, Sergio G Nebauer, Mercedes Royuela, Ramon Serrano, and Jose Gadea. 2015. "Protein Kinase GCN2 Mediates Responses to Glyphosate in Arabidopsis." *BMC Plant Biology* 15: 14. doi:10.1186/s12870-014-0378-0.
- Ferreira, Ricardo B., Sara Monteiro, Regina Freitas, Claudia N Santos, Zhenjia Chen, Luis M Batista, Joao Duarte, Alexandre Borges, and Artur R. Teixeira. 2007. "The Role of Plant Defence Proteins in Fungal Pathogenesis." *Molecular Plant Pathology* 8 (5): 677–700. doi:10.1111/J.1364-3703.2007.00419.X.
- Fonseca, Sandra, Andrea Chini, Mats Hamberg, Bruce Adie, Andrea Porzel, Robert Kramell, Otto Miersch, Claus Wasternack, and Roberto Solano. 2009. "(+)-7-Iso-Jasmonoyl-L-Isoleucine Is the Endogenous Bioactive Jasmonate." *Nat Chem Biol* 5 (5). Nature Publishing Group: 344–50.
- Fu, Zheng Qing, and Xinnian Dong. 2013. "Systemic Acquired Resistance : Turning Local Infection into Global Defense." *Annual Review of Plant Biology* 64: 839–63. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105606.
- Fu, Zheng Qing, Shunping Yan, Abdelaty Saleh, Wei Wang, James Ruble, Nodoka Oka, and Rajinikanth Mohan. 2012. "NPR3 and NPR4 Are Receptors for the Immune Signal Salicylic Acid in Plants." *Nature* 486 (7402). Nature Publishing Group: 228–32. doi:10.1038/nature11162.
- Funk, C D. 2001. "Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology." *Science* 294 (5548): 1871–75. doi:10.1126/science.294.5548.1871.
- Garcia-Barrio, M, J Dong, S Ufano, and A G Hinnebusch. 2000. "Association of GCN1-GCN20 Regulatory Complex with the N-Terminus of eIF2alpha Kinase GCN2 Is Required for GCN2 Activation." *The EMBO Journal* 19 (8): 1887–99. doi:10.1093/emboj/19.8.1887.
- Goldbach, Heiner E., and Monika A. Wimmer. 2007. "Boron in Plants and Animals: Is There a Role beyond Cell-Wall Structure?" *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 170 (1): 39–48. doi:10.1002/jpln.200625161.
- Gutierrez-campos, Rafael, Juan Antonio Torres-acosta, Luis Jorge Saucedo-arias, and Miguel Angel Gomez-lim. 1999. "The Use of Cysteine Proteinase Inhibitors to Engineer Resistance against Potyviruses in Transgenic Tobacco Plants." *Nature Biotechnology* 17: 1223–26.
- Guzel Deger, Aysin, Sönke Scherzer, Maris Nuhkat, Justyna Kedzierska, Hannes Kollist, Mikael Brosché, Serpil Unyayar, Marie Boudsocq, Rainer Hedrich, and M. Rob G Roelfsema. 2015. "Guard Cell SLAC1-Type Anion Channels Mediate Flagellin-Induced Stomatal

- Closure." *New Phytologist* 208 (1): 162–73. doi:10.1111/nph.13435.
- Haeggström, Jesper Z., and Colin D. Funk. 2011. "Lipoxygenase and Leukotriene Pathways: Biochemistry, Biology, and Roles in Disease." *Chemical Reviews* 111 (10): 5866–96. doi:10.1021/cr200246d.
- Ham, Jong Hyun, Min Gab Kim, Sang Yeol Lee, David Mackey, Environmental Biotechnology, National Core, and Kottman Hall. 2007. "Layered Basal Defenses Underlie Non-Host Resistance of Arabidopsis to Pseudomonas Syringae Pv . Phaseolicola." *The Plant Journal* 51: 604–16. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03165.x.
- Hamberg, Mats, Ana Sanz, Maria Josefa Rodriguez, Angel Pablo Calvo, and Carmen Castresana. 2003. "Activation of the Fatty Acid ω -Dioxygenase Pathway during Bacterial Infection of Tobacco Leaves: Formation of Oxylipins Protecting against Cell Death." *Journal of Biological Chemistry* 278 (51): 51796–805. doi:10.1074/jbc.M310514200.
- Hayden, Celine a, and Richard a Jorgensen. 2007. "Identification of Novel Conserved Peptide uORF Homology Groups in Arabidopsis and Rice Reveals Ancient Eukaryotic Origin of Select Groups and Preferential Association with Transcription Factor-Encoding Genes." *BMC Biology* 5: 32. doi:10.1186/1741-7007-5-32.
- Hinnebusch, Alan G. 2005. "TRANSLATIONAL REGULATION OF GCN4 AND THE GENERAL AMINO ACID CONTROL OF YEAST*." *Annual Review of Microbiology* 59 (1): 407–50. doi:10.1146/annurev.micro.59.031805.133833.
- Hirose, Takashi, and H. Robert Horvitz. 2014. "The Translational Regulators GCN-1 and ABCF-3 Act Together to Promote Apoptosis in C. Elegans." *PLoS Genetics* 10 (8). doi:10.1371/journal.pgen.1004512.
- Hong, Fei, Michael L. Freeman, and Daniel C. Liebler. 2005. "Identification of Sensor Cysteines in Human Keap1 Modified by the Cancer Chemopreventive Agent Sulforaphane." *Chemical Research in Toxicology* 18 (12): 1917–26. doi:10.1021/tx0502138.
- Horiguchi, Gorou, Mieke Van Lijsebettens, Héctor Candela, José Luis Micol, and Hirokazu Tsukaya. 2012. "Ribosomes and Translation in Plant Developmental Control." *Plant Science* 191–192. Elsevier Ireland Ltd: 24–34. doi:10.1016/j.plantsci.2012.04.008.
- Hummel, Maureen, Jan H G Cordewener, Joost C M de Groot, Sjef Smeekens, Antoine H P America, and Johannes Hanson. 2012. "Dynamic Protein Composition of Arabidopsis Thaliana Cytosolic Ribosomes in Response to Sucrose Feeding as Revealed by Label Free MS E Proteomics." *Proteomics* 12 (7): 1024–38. doi:10.1002/pmic.201100413.
- Huot, Bethany, Jian Yao, Beronda L. Montgomery, and Sheng Yang He. 2014. "Growth-Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness." *Molecular Plant* 7 (8): 1267–87. doi:10.1093/mp/ssu049.
- Ishiga, Yasuhiro, Takako Ishiga, Srinivasa R Uppalapati, and Kirankumar S Mysore. 2011. "Arabidopsis Seedling Flood-Inoculation Technique: A Rapid and Reliable Assay for Studying Plant-Bacterial Interactions." *Plant Methods* 7 (1): 32. doi:10.1186/1746-4811-7-32.
- Johnston, Amal J, Patrick Meier, Jacqueline Gheyselinck, Samuel Ej Wuest, Michael Federer, Edith Schlagenhauf, Jörg D Becker, and Ueli Grossniklaus. 2007. "Genetic Subtraction Profiling Identifies Genes Essential for Arabidopsis Reproduction and Reveals Interaction between the Female Gametophyte and the Maternal Sporophyte." *Genome Biology* 8 (10): R204. doi:10.1186/gb-2007-8-10-r204.
- Jones, Jonathan D G, and Jeffery L Dangl. 2006. "The Plant Immune System." *Nature* 444: 323–29. doi:10.1038/nature05286.

- Juntawong, Piyada, Thomas Girke, Jérémie Bazin, and Julia Bailey-Serres. 2014. "Translational Dynamics Revealed by Genome-Wide Profiling of Ribosome Footprints in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (1): E203-12. doi:10.1073/pnas.1317811111.
- Katsir, Leron, Anthony L Schillmiller, Paul E Staswick, Sheng Yang He, and Gregg A Howe. 2008. "COI1 Is a Critical Component of a Receptor for Jasmonate and the Bacterial Virulence Factor Coronatine." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (19): 1–6.
- Kawaguchi, Riki, Thomas Girke, Elizabeth A. Bray, and Julia Bailey-Serres. 2004. "Differential mRNA Translation Contributes to Gene Regulation under Non-Stress and Dehydration Stress Conditions in Arabidopsis Thaliana." *Plant Journal* 38 (5): 823–39. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02090.x.
- Kendrick, Mandy D, and Caren Chang. 2008. "Ethylene Signaling: New Levels of Complexity and Regulation." *Current Opinion in Plant Biology* 11 (5): 479–85. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2008.06.011.
- Kleinboelting, Nils, Gunnar Huep, Andreas Kloetgen, Prisca Viehoveer, and Bernd Weisshaar. 2012. "GABI-Kat SimpleSearch: New Features of the Arabidopsis Thaliana T-DNA Mutant Database." *Nucleic Acids Research* 40 (D1): D1211–15.
- Komili, Suzanne, Natalie G. Farny, Frederick P. Roth, and Pamela A. Silver. 2007. "Functional Specificity among Ribosomal Proteins Regulates Gene Expression." *Cell* 131 (3): 557–71. doi:10.1016/j.cell.2007.08.037.
- Koornneef, Annemart, and Corné M J Pieterse. 2008. "Cross Talk in Defense Signaling." *Plant Physiology* 146 (3): 839–44. doi:10.1104/pp.107.112029.
- Kubota, Hiroyuki, Yoshiyuki Sakaki, and Takashi Ito. 2000. "GI Domain-Mediated Association of the Eukaryotic Initiation Factor 2?? Kinase GCN2 with Its Activator GCN1 Is Required for General Amino Acid Control in Budding Yeast." *Journal of Biological Chemistry* 275 (27): 20243–46. doi:10.1074/jbc.C000262200.
- Kulasekaran, Satish. 2012. "IDENTIFICATION OF GENES CONTROLLING THE ACTION OF 9-LOX OXYLIPINS IN PLANT DEFENSE." Universidad Autónoma de Madrid.
- Lageix, Sébastien, Elodie Lanet, Marie-Noëlle Pouch-Pélissier, Marie-Claude Espagnol, Christophe Robaglia, Jean-Marc Deragon, and Thierry Pélissier. 2008. "Arabidopsis eIF2alpha Kinase GCN2 Is Essential for Growth in Stress Conditions and Is Activated by Wounding." *BMC Plant Biology* 8 (1): 134. doi:10.1186/1471-2229-8-134.
- Lee, Su Jung, Mark J. Swanson, and Evelyn Sattlegger. 2015. "Gcn1 Contacts the Small Ribosomal Protein Rps10, Which Is Required for Full Activation of the Protein Kinase Gcn2." *Biochemical Journal* 466 (3): 547–59. doi:10.1042/BJ20140782.
- Leon-Reyes, Antonio, Yajuan Du, Annemart Koornneef, Silvia Proietti, Ana P Körbes, Johan Memelink, Corné M J Pieterse, and Tita Ritsema. 2010. "Ethylene Signaling Renders the Jasmonate Response of Arabidopsis Insensitive to Future Suppression by Salicylic Acid." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23 (2). Scientific Societies: 187–97. doi:10.1094/MPMI-23-2-0187.
- Li, Hui, Xiao-Lei Zhu, Wen-Chao Yang, and Guang-Fu Yang. 2014. "Comparative Kinetics of Qi Site Inhibitors of Cytochrome bc1 Complex: Picomolar Antimycin and Micromolar Cyazofamid." *Chemical Biology & Drug Design* 83 (1): 71–80. doi:10.1111/cbdd.12199.
- Li, M. W., W. K. Auyeung, and H. M. Lam. 2013. "The GCN2 Homologue in Arabidopsis Thaliana Interacts with Uncharged tRNA and Uses Arabidopsis eIF2α Molecules as Direct Substrates." *Plant Biology* 15 (1): 13–18. doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00606.x.

- Logemann, Jürgen, Jeff Schell, and Lothar Willmitzer. 1987. "Improved Method for the Isolation of RNA from Plant Tissues." *Analytical Biochemistry* 163 (1). Academic Press: 16–20. doi:10.1016/0003-2697(87)90086-8.
- Loon, L C Van. 2007. "Plant Responses to Plant Growth-Promoting Rhizobacteria." *Eur J Plant Pathol* 119: 243–54. doi:10.1007/s10658-007-9165-1.
- Loon, L C Van, P A H M Bakker, and C M J Pieterse. 1998. "SYSTEMIC RESISTANCE INDUCED BY RHIZOSPHERE BACTERIA." *Annual Review of Phytopathology* 36.
- López, Miguel A., Jorge Vicente, Satish Kulasekaran, Tamara Velloso, Marta Martínez, Maria L. Irigoyen, Tomas Cascón, Gerard Bannenberg, Mats Hamberg, and Carmen Castresana. 2011. "Antagonistic Role of 9-Lipoxygenase-Derived Oxylipins and Ethylene in the Control of Oxidative Stress, Lipid Peroxidation and Plant Defence." *Plant Journal* 67 (3): 447–58. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04608.x.
- López, Miguel Angel, Gerard Bannenberg, and Carmen Castresana. 2008. "Controlling Hormone Signaling Is a Plant and Pathogen Challenge for Growth and Survival." *Current Opinion in Plant Biology* 11 (4): 420–27. doi:10.1016/j.pbi.2008.05.002.
- Lorenzo, Oscar, Raquel Piqueras, Jose J Sánchez-Serrano, and Roberto Solano. 2003. "ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense." *The Plant Cell* 15 (1): 165–78. doi:10.1105/tpc.007468.
- Lu, Phoebe D., Heather P. Harding, and David Ron. 2004. "Translation Reinitiation at Alternative Open Reading Frames Regulates Gene Expression in an Integrated Stress Response." *Journal of Cell Biology* 167 (1): 27–33. doi:10.1083/jcb.200408003.
- Malzer, Elke, Malgorzata Szajewska-Skuta, Lucy E Dalton, Sally E Thomas, Nan Hu, Helen Skaer, David a Lomas, Damian C Crowther, and Stefan J Marciniak. 2013. "Coordinate Regulation of eIF2 α Phosphorylation by PPP1R15 and GCN2 Is Required during Drosophila Development." *Journal of Cell Science* 126 (Pt 6): 1406–15. doi:10.1242/jcs.117614.
- Marcos, Ruth, Yovanny Izquierdo, Tamara Velloso, Satish Kulasekaran, Tomás Cascón, Mats Hamberg, and Carmen Castresana. 2015. "9-Lipoxygenase-Derived Oxylipins Activate Brassinosteroid Signaling to Promote Cell Wall-Based Defense and Limit Pathogen Infection." *Plant Physiology* 4 (November): pp.00992.2015. doi:10.1104/pp.15.00992.
- Marton, M J, D Crouch, and A G Hinnebusch. 1993. "GCN1, a Translational Activator of GCN4 in *Saccharomyces Cerevisiae*, Is Required for Phosphorylation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 by Protein Kinase GCN2." *Molecular and Cellular Biology* 13 (6): 3541–56. doi:10.1128/MCB.13.6.3541.Updated.
- Mauro, Vincent P., and Gerald M. Edelman. 2002. "The Ribosome Filter Hypothesis." *Pnas* 99 (19): 12031–36. doi:10.1073/pnas.192442499.
- Melotto, Maeli, William Underwood, Jessica Koczan, Kinya Nomura, and Sheng Yang He. 2006. "Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion." *Cell* 126 (5): 969–80. doi:10.1016/j.cell.2006.06.054.
- Merchante, Catharina, Javier Brumos, Jeonga Yun, Qiwen Hu, Kristina R. Spencer, Paul Enríquez, Brad M. Binder, Steffen Heber, Anna N. Stepanova, and Jose M. Alonso. 2015. "Gene-Specific Translation Regulation Mediated by the Hormone-Signaling Molecule EIN2." *Cell* 163 (3): 684–97. doi:10.1016/j.cell.2015.09.036.
- Miller, Gad, Karen Schlauch, Rachel Tam, Diego Cortes, Miguel A Torres, Vladimir Shulaev, Jeffery L Dangl, and Ron Mittler. 2009. "The Plant NADPH Oxidase RBOHD Mediates Rapid Systemic Signaling in Response to Diverse Stimuli." *Science Signaling* 2 (84): ra45. doi:10.1126/scisignal.2000448.

- Monaghan, Jacqueline, and Xin Li. 2010. "The HEAT Repeat Protein ILITYHIA Is Required for Plant Immunity." *Plant and Cell Physiology* 51 (5): 742–53. doi:10.1093/pcp/pcq038.
- Montillet, Jean Luc, Nathalie Leonhardt, Samuel Mondy, Sylvain Tranchimand, Dominique Rumeau, Marie Boudsocq, Ana Victoria Garcia, et al. 2013. "An Absciscic Acid-Independent Oxylin Pathway Controls Stomatal Closure and Immune Defense in Arabidopsis." *PLoS Biology* 11 (3). doi:10.1371/journal.pbio.1001513.
- Morello, Luis G, Cédric Hesling, Patrícia P Coltri, Beatriz A Castilho, Ruth Rimokh, and Nilson I T Zanchin. 2011. "The NIP7 Protein Is Required for Accurate Pre-rRNA Processing in Human Cells." *Nucleic Acids Research* 39 (2). Oxford University Press: 648–65. doi:10.1093/nar/gkq758.
- Mou, Zhonglin, Weihua Fan, Xinnian Dong, and North Carolina. 2003. "Inducers of Plant Systemic Acquired Resistance Regulate NPR1 Function through Redox Changes." *Cell* 113: 935–44.
- Murashige, Toshio, and Folke Skoog. 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures." *Physiologia Plantarum* 15 (3): 473–97. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Mustroph, Angelika, M Eugenia Zanetti, Charles J H Jang, Hans E Holtan, Peter P Repetti, David W Galbraith, Thomas Girke, and Julia Bailey-Serres. 2009. "Profiling Translatomes of Discrete Cell Populations Resolves Altered Cellular Priorities during Hypoxia in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44): 18843–48. doi:10.1073/pnas.0906131106.
- Ng, S, A Ivanova, O Duncan, S R Law, O Van Aken, I De Clercq, Y Wang, et al. 2013. "A Membrane-Bound NAC Transcription Factor, ANAC017, Mediates Mitochondrial Retrograde Signaling in Arabidopsis." *Plant Cell* 25 (9): 3450–71. doi:10.1105/tpc.113.113985.
- Nu, Thorsten, Birgit Kemmerling, and Lizelle Piater. 2004. "Innate Immunity in Plants and Animals : Striking Similarities and Obvious Differences." *Immunological Reviews* 198: 249–66.
- Nurnberger, Thorsten, and Volker Lipka. 2005. "Non-Host Resistance in Plants : New Insights into an Old Phenomenon." *Molecular Plant Pathology* 6 (3): 335–45. doi:10.1111/J.1364-3703.2004.00279.X.
- Oerke, E. C., and H. W. Dehne. 2004. "Safeguarding Production - Losses in Major Crops and the Role of Crop Protection." *Crop Protection* 23 (4): 275–85. doi:10.1016/j.cropro.2003.10.001.
- Pajerowska-Mukhtar, Karolina M., Wei Wang, Yasuomi Tada, Nodoka Oka, Chandra L. Tucker, Jose Pedro Fonseca, and Xinnian Dong. 2012. "The HSF-like Transcription Factor TBF1 Is a Major Molecular Switch for Plant Growth-to-Defense Transition." *Current Biology* 22 (2). Elsevier Ltd: 103–12. doi:10.1016/j.cub.2011.12.015.
- Passardi, Filippo, Claude Penel, and Christophe Dunand. 2004. "Performing the Paradoxical : How Plant Peroxidases Modify the Cell Wall." *Trends in Plant Science* 9 (11). doi:10.1016/j.tplants.2004.09.002.
- Pieterse, Corné M J, Antonio Leon-Reyes, Sjoerd Van der Ent, and Saskia C M Van Wees. 2009. "Networking by Small-Molecule Hormones in Plant Immunity." *Nature Chemical Biology* 5 (5): 308–16. doi:10.1038/nchembio.164.
- Pré, Martial, Mirna Atallah, Antony Champion, Martin De Vos, Corné M J Pieterse, and Johan Memelink. 2008. "The AP2/ERF Domain Transcription Factor ORA59 Integrates Jasmonic Acid and Ethylene Signals in Plant Defense." *Plant Physiology* 147 (3): 1347–57.

- doi:10.1104/pp.108.117523.
- Prost, I, S Dhondt, G Rothe, J Vicente, M J Rodriguez, N Kift, F Carbonne, et al. 2005. "Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylipins Supports Their Involvement in Defense against Pathogens." *Plant Physiol* 139 (4): 1902–13. doi:10.1104/pp.105.066274.
- Rochon, Amanda, Patrick Boyle, Tracy Wignes, Pierre R Fobert, and Charles Despre. 2006. "The Coactivator Function of Arabidopsis NPR1 Requires the Core of Its BTB / POZ Domain and the Oxidation of C-Terminal Cysteines." *The Plant Cell* 18 (December): 3670–85. doi:10.1105/tpc.106.046953.
- Saini, Preeti, Daniel Eyler, Rachel Green, and Thomas Dever. 2009. "Hypusine-Containing Protein eIF5A Promotes Translation Elongation." *Nature* 459 (7243). Nature Publishing Group: 118–21. doi:citeulike-article-id:4483737\rdoi: 10.1038/nature08034.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sattlegger, E, and A G Hinnebusch. 2000. "Separate Domains in GCN1 for Binding Protein Kinase GCN2 and Ribosomes Are Required for GCN2 Activation in Amino Acid-Starved Cells." *The EMBO Journal* 19 (23): 6622–33. doi:10.1093/emboj/19.23.6622.
- Sels, Jan, Janick Mathys, Barbara M A De Coninck, Bruno P A Cammue, and Miguel F C De Bolle. 2008. "Plant Physiology and Biochemistry Plant Pathogenesis-Related (PR) Proteins : A Focus on PR Peptides." *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 941–50. doi:10.1016/j.plaphy.2008.06.011.
- Shaikhin, S. M., S. K. Smailov, A. V. Lee, E. V. Kozhanov, and B. K. Iskakov. 1992. "Interaction of Wheat Germ Translation Initiation Factor 2 with GDP and GTP." *Biochimie* 74 (5): 447–54. doi:10.1016/0300-9084(92)90085-S.
- Shetty, Nandini P, Hans J Lyngs Jørgensen, Jens Due Jensen, David B Collinge, and H Shekar Shetty. 2008. "Roles of Reactive Oxygen Species in Interactions between Plants and Pathogens." *Eur J Plant Pathol*, 267–80. doi:10.1007/s10658-008-9302-5.
- Sonenberg, Nahum, and Alan G. Hinnebusch. 2009. "Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets." *Cell* 136 (4). Elsevier Inc.: 731–45. doi:10.1016/j.cell.2009.01.042.
- Strange, Richard N, and Peter R Scott. 2005. "Plant Disease: A Threat to Global Food Security." *Phytopathology* 43 (Figure 1): 83–116. doi:10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839.
- Taki, Nozomi, Yuko Sasaki-sekimoto, Takeshi Obayashi, Akihiro Kikuta, and Koichi Kobayashi. 2005. "12-Oxo-Phytodienoic Acid Triggers Expression of a Distinct Set of Genes and Plays a Role in Wound-Induced Gene Expression in Arabidopsis 1 [W]." *Plant Physiology* 139 (November): 1268–83. doi:10.1104/pp.105.067058.1268.
- Tanaka, Mayuki, Naoyuki Sotta, Yusuke Yamazumi, Yui Yamashita, Kyoko Miwa, Katsunori Murota, Yukako Chiba, et al. 2016. "The Minimum Open Reading Frame, AUG-Stop, Induces Boron-Dependent Ribosome Stalling and mRNA Degradation." *The Plant Cell*, tpc.00481.2016. doi:10.1105/tpc.16.00481.
- Tanaka, Mayuki, Junpei Takano, Yukako Chiba, Fabien Lombardo, Yuki Ogasawara, Hitoshi Onouchi, Satoshi Naito, and Toru Fujiwara. 2011. "Boron-Dependent Degradation of NIP5;1 mRNA for Acclimation to Excess Boron Conditions in Arabidopsis." *Plant Cell* 23 (9): 3547–59. doi:10.1105/tpc.111.088351.

- Tibshirani, R, J H Friedman, T K Mayeda, T W Lyons, S J Devlin, B Rajagopalan, U Lall, et al. 2011. "The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution." *Science*, no. December: 1524–29. doi:10.1126/science.1212642.
- Ton, Jurriaan, Victor Flors, and Brigitte Mauch-mani. 2009. "The Multifaceted Role of ABA in Disease Resistance." *Trends in Plant Science* 14 (6). doi:10.1016/j.tplants.2009.03.006.
- Ulusik, Irem, Alaattin Kaya, Dmitri E. Fomenko, Huseyin C. Karakaya, Bradley A. Carlson, Vadim N. Gladyshev, and Ahmet Koc. 2011. "Boron Stress Activates the General Amino Acid Control Mechanism and Inhibits Protein Synthesis." *PLoS ONE* 6 (11). doi:10.1371/journal.pone.0027772.
- Ulusik, Irem, Alaattin Kaya, Ercan S. Unlu, Kadir Avsar, Huseyin C. Karakaya, Talat Yalcin, and Ahmet Koc. 2011. "Genome-Wide Identification of Genes That Play a Role in Boron Stress Response in Yeast." *Genomics* 97 (2): 106–11. doi:10.1016/j.ygeno.2010.10.006.
- Vattem, Krishna M, and Ronald C Wek. 2004. "Reinitiation Involving Upstream ORFs Regulates ATF4 mRNA Translation in Mammalian Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (31): 11269–74. doi:10.1073/pnas.0400541101.
- Vazquez de Aldana, C R, M J Marton, and A G Hinnebusch. 1995. "GCN20, a Novel ATP Binding Cassette Protein, and GCN1 Reside in a Complex That Mediates Activation of the eIF-2 Alpha Kinase GCN2 in Amino Acid-Starved Cells." *The EMBO Journal* 14 (13): 3184–99.
- Vellosillo, Tamara, Verónica Aguilera, Ruth Marcos, Michael Bartsch, Jorge Vicente, Tomas Cascón, Mats Hamberg, and Carmen Castresana. 2013. "Defense Activated by 9-Lipoxygenase-Derived Oxylipins Requires Specific Mitochondrial Proteins 1 [W]." *Plant Physiology* 161 (February): 617–27. doi:10.1104/pp.112.207514.
- Vellosillo, Tamara, Marta Martínez, Miguel Angel López, Jorge Vicente, Tomas Cascón, Liam Dolan, Mats Hamberg, and Carmen Castresana. 2007. "Oxylipins Produced by the 9-Lipoxygenase Pathway in Arabidopsis Regulate Lateral Root Development and Defense Responses through a Specific Signaling Cascade." *The Plant Cell* 19 (3): 831–46. doi:10.1105/tpc.106.046052.
- Vicente, Jorge, Tomás Cascón, Begonya Vicedo, Pilar García-Agustín, Mats Hamberg, and Carmen Castresana. 2012. "Role of 9-Lipoxygenase and α -Dioxygenase Oxylipin Pathways as Modulators of Local and Systemic Defense." *Molecular Plant* 5 (4): 914–28. doi:10.1093/mp/ssr105.
- Vila, Laura, Jordi Quilis, Donaldo Meynard, Jean Christophe Breitler, Victoria Marfà, Isabel Murillo, Jean Michel Vassal, Joaquima Messeguer, Emmanuel Guiderdoni, and Blanca San Segundo. 2005. "Expression of the Maize Proteinase Inhibitor (Mpi) Gene in Rice Plants Enhances Resistance against the Striped Stem Borer (Chilo Suppressalis): Effects on Larval Growth and Insect Gut Proteinases." *Plant Biotechnology Journal* 3: 187–202. doi:10.1111/j.1467-7652.2004.00117.x.
- Von Arnim, Albrecht G., Qidong Jia, and Justin N. Vaughn. 2014. "Regulation of Plant Translation by Upstream Open Reading Frames." *Plant Science* 214. Elsevier Ireland Ltd: 1–12. doi:10.1016/j.plantsci.2013.09.006.
- Wang, Jinyan, Ping Lan, Huimin Gao, Lu Zheng, Wenfeng Li, and Wolfgang Schmidt. 2013. "Expression Changes of Ribosomal Proteins in Phosphate- and Iron-Deficient Arabidopsis Roots Predict Stress-Specific Alterations in Ribosome Composition." *BMC Genomics* 14: 1. doi:10.1186/1471-2164-14-783.

- Wang, Kevin L.-C., Hai Li, and Joseph R Ecker. 2002. "Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks." *The Plant Cell* 14 (suppl 1): S131–51. doi:10.1105/tpc.001768.
- Wang, Linjuan, Houhua Li, Chunzhao Zhao, Shengfei Li, Lingyao Kong, Wenwu Wu, Weisheng Kong, et al. 2016. "The Inhibition of Protein Translation Mediated by AtGCN1 Is Essential for Cold Tolerance in *Arabidopsis Thaliana*." *Plant, Cell & Environment*. doi:10.1111/pce.12826.
- Wek, R C, H-Y Jiang, and T G Anthony. 2006. "Coping with Stress: eIF2 Kinases and Translational Control." *Biochemical Society Transactions* 34 (Pt 1): 7–11. doi:10.1042/BST20060007.
- Wek, S A, S Zhu, and R C Wek. 1995. "The Histidyl-tRNA Synthetase-Related Sequence in the eIF-2 Alpha Protein Kinase GCN2 Interacts with tRNA and Is Required for Activation in Response to Starvation for Different Amino Acids." *Molecular and Cellular Biology* 15 (8): 4497–4506. doi:10.1128/MCB.15.8.4497.
- Whalen, M C, R W Innes, A F Bent, and B J Staskawicz. 1991. "Identification of *Pseudomonas Syringae* Pathogens of *Arabidopsis* and a Bacterial Locus Determining Avirulence on Both *Arabidopsis* and Soybean." *The Plant Cell* 3 (1): 49–59. doi:10.1105/tpc.3.1.49.
- Wildermuth, Mary C, Julia Dewdney, Gang Wu, and Frederick M Ausubel. 2001. "Isochorismate Synthase Is Required to Synthesize Salicylic Acid for Plant Defence." *Nature* 414 (November): 0–4.
- Wirthmueller, Lennart, Yan Zhang, Jonathan D G Jones, Jane E Parker, and Colney Lane. 2007. "Nuclear Accumulation of the *Arabidopsis* Immune Receptor RPS4 Is Necessary for Triggering EDS1-Dependent Defense." *Current Biology* 17: 2023–29. doi:10.1016/j.cub.2007.10.042.
- Wittek, Finni, Thomas Hoffmann, Basem Kanawati, Marlies Bichlmeier, Claudia Knappe, Marion Wenig, Philippe Schmitt-Kopplin, Jane E. Parker, Wilfried Schwab, and A. Corina Vlot. 2014. "Arabidopsis ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 Promotes Systemic Acquired Resistance via Azelaic Acid and Its Precursor 9-Oxo Nonanoic Acid." *Journal of Experimental Botany* 65 (20): 5919–31. doi:10.1093/jxb/eru331.
- Wu, Yue, Di Zhang, Jee Yan Chu, Patrick Boyle, Yong Wang, Ian D. Brindle, Vincenzo De Luca, and Charles Després. 2012. "The *Arabidopsis* NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid." *Cell Reports* 1 (6): 639–47. doi:10.1016/j.celrep.2012.05.008.
- Xin, Xiu-Fang, and Sheng Yang He. 2013. "*Pseudomonas Syringae* Pv. Tomato DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants." *Annual Review of Phytopathology* 51 (1): 473–98. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102321.
- Yan, Jianbin, Chi Zhang, Min Gu, Zhiyan Bai, Weiguo Zhang, Tiancong Qi, Zhiwei Cheng, and Wen Peng. 2009. "The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 Protein Is a Jasmonate Receptor." *The Plant Cell* 21 (August): 2220–36. doi:10.1105/tpc.109.065730.
- Yang, R, S A Wek, and R C Wek. 2000. "Glucose Limitation Induces GCN4 Translation by Activation of Gcn2 Protein Kinase." *Molecular and Cellular Biology* 20 (8): 2706–17. doi:10.1128/MCB.20.8.2706-2717.2000.
- Yoshihama, Maki, Tamayo Uechi, Shuichi Asakawa, Kazuhiko Kawasaki, Seishi Kato, Sayomi Higa, Noriko Maeda, et al. 2002. "The Human Ribosomal Protein Genes : Sequencing and Comparative Analysis of 73 Genes The Human Ribosomal Protein Genes : Sequencing and Comparative Analysis of 73 Genes," 379–90. doi:10.1101/gr.214202.
- Yun, Byung-Wook, Angela Feechan, Minghui Yin, Noor B. B. Saidi, Thierry Le Bihan, Manda Yu, John W. Moore, et al. 2011. "S-Nitrosylation of NADPH Oxidase Regulates Cell Death in Plant Immunity." *Nature* 3000 (7368). Nature Publishing Group: 264–68.

- doi:10.1038/nature10427.
- Zeng, Weiqing, Alexandre Brutus, James M. Kremer, John C. Withers, Xiaoli Gao, A. Daniel Da Jones, and Sheng Yang He. 2011. "A Genetic Screen Reveals Arabidopsis Stomatal And/or Apoplastic Defenses against *Pseudomonas Syringae* Pv. Tomato DC3000." *PLoS Pathogens* 7 (10). doi:10.1371/journal.ppat.1002291.
- Zhang, Xudong, Sixue Chen, and Zhonglin Mou. 2010. "Nuclear Localization of NPR1 Is Required for Regulation of Salicylate Tolerance , Isochorismate Synthase 1 Expression and Salicylate Accumulation in Arabidopsis." *Jl of Plant Physiology* 167 (2). Elsevier: 144–48. doi:10.1016/j.jplph.2009.08.002.
- Zhang, Yuhua, Yifei Wang, Kostya Kanyuka, Martin A J Parry, Stephen J. Powers, and Nigel G. Halford. 2008. "GCN2-Dependent Phosphorylation of Eukaryotic Translation Initiation Factor-2?? In Arabidopsis." *Journal of Experimental Botany* 59 (11): 3131–41. doi:10.1093/jxb/ern169.
- Zhao, Youfu, Roger Thilmony, Carol L. Bender, Andreas Schaller, Sheng Yang He, and Gregg A. Howe. 2003. "Virulence Systems of *Pseudomonas Syringae* Pv. Tomato Promote Bacterial Speck Disease in Tomato by Targeting the Jasmonate Signaling Pathway." *Plant Journal* 36 (4): 485–99. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01895.x.
- Zhou, Jun-ma, Youssef Trifa, Herman Silva, Dominique Pontier, Eric Lam, Jyoti Shah, and Daniel F Klessig. 2000. "NPR1 Differentially Interacts with Members of the TGA / OBF Family of Transcription Factors That Bind an Element of the PR-1 Gene Required for Induction by Salicylic Acid." *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI* 13 (2): 191–202.
- Zipfel, Cyril. 2008. "Pattern-Recognition Receptors in Plant Innate Immunity." *Current Opinion in Plant Biology* 20: 10–16. doi:10.1016/j.coi.2007.11.003.
- Zipfel, Cyril, and Georg Felix. 2005. "Plants and Animals : A Different Taste for Microbes ?" *Current Opinion in Plant Biology* 8: 353–60. doi:10.1016/j.pbi.2005.05.004.
- Zoeller, M., N. Stingl, M. Krischke, A. Fekete, F. Waller, S. Berger, and M. J. Mueller. 2012. "Lipid Profiling of the Arabidopsis Hypersensitive Response Reveals Specific Lipid Peroxidation and Fragmentation Processes: Biogenesis of Pimelic and Azelaic Acid." *Plant Physiology* 160 (1): 365–78. doi:10.1104/pp.112.202846.

